



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## STUDIUM MIGRACE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK NA PRINCIPU CHEMOTAXE

STUDY OF MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION BASED ON PRINCIPLES OF CHEMOTAXIS

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Pošustová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Baiazitova

BRNO 2020

# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské a ekologické inženýrství**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Studentka:** Bc. Veronika Pošustová

**ID:** 186681

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2019/20

## NÁZEV TÉMATU:

**Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk na principu chemotaxe**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši v oblasti in vitro metod sledování migrace buněk. 2) Navrhněte experiment pro studium migrace mesenchymálních kmenových buněk (MSC) na principu chemotaxe. 3) Nastudujte kultivaci buněčné linie MSC a prakticky ověřte v buněčné laboratoři. 4) Ověřte navržený experiment a proveďte sběr mikroskopických dat. 5) Ve vhodném programovém prostředí zpracujte nasnímaná data. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] VASATURO, Angela, et al. A novel chemotaxis assay in 3-D collagen gels by time-lapse microscopy. PloS one, 2012, 7.12: e52251.

[2] RAJA, Waseem Khan, et al. A new chemotaxis device for cell migration studies. Integrative Biology, 2010, 2.11-12: 696-706.

**Termín zadání:** 3.2.2020

**Termín odevzdání:** 29.5.2020

**Vedoucí práce:** Larisa Baiazitova

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**  
předseda oborové rady

## UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## Abstrakt

Cílem této diplomové práce je ověření migrace mesenchymálních kmenových buněk na principu chemotaxe. První část této studie se zaměřuje na popis a vysvětlení celého migračního procesu. Další část popisuje řadu metod chemotaxe a vybrané studie zabývající se klinickými aplikacemi MSC v různých odvětvích medicíny a biomedicíny. V dalším kroku je popsána konfokální mikroskopie, která je použita pro získání dat. Experimentální část této práce je zaměřena na kultivaci MSC v buněčné laboratoři. Dále jsou navrženy dva experimenty. Za prvé se jedná o 2D experiment s adherentními buňkami pro chemotaxi, který využívá nástroj *μ-Slide Chemotaxis*. Za druhé je navržen a proveden *Transwell* migrační test. Nakonec jsou obrazy, získané konfokální mikroskopií, použity pro zpracování a vyhodnocení výsledků, které probíhalo v programovacím prostředí Matlab R2020a. Výstupem tohoto zpracování je zhodnocení konfluency buněk a vyhodnocení jejich migrace. Experimentální část byla dále optimalizována podle doporučených studií. Výsledky jsou shrnuty společně s návrhem na další optimalizaci metod buněčné migrace.

## Klíčová slova

Mesenchymální kmenové buňky, MSC, chemotaxe, buněčná migrace, chemoatraktant, *μ-Slide Chemotaxis*, *Transwell* migrační test, konfokální mikroskopie

## Abstract

The purpose of this Master thesis is to verify migration of mesenchymal stem cells on the principle known as chemotaxis. First part of this study is focused on cell migration in order to explain the whole migration process. Next part describes various chemotaxis methods and selected studies dealing with clinical applications of mesenchymal stem cells in different medical and biomedical fields. The following step describes confocal microscopy, which is used for acquiring images of the cells. The experimental part is focused on cultivation of mesenchymal stem cells in a laboratory, which is necessary for cell vitality. Furthermore, there are designed two main experiments. Firstly there is a 2D experiment with adherent cells for chemotaxis using *μ-Slide Chemotaxis*. Secondly *Transwell* migration test is designed and executed. Finally, the acquired images from confocal microscope are used for image processing, which was done in Matlab R2020a programming environment. The result of this processing is evaluation of cell confluence and migration. In the end, experimental part of this study was optimized according to recommended studies. The results are summarized in the conclusion with proposal for improvements of those methods.

## Keywords

Mesenchymal stem cells, MSC, chemotaxis, cell migration, chemoattractant, *μ-Slide Chemotaxis*, *Transwell* migration assay, confocal microscopy

## **Bibliografická citace:**

POŠUSTOVÁ, Veronika. *Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk na principu chemotaxe* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/126748>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Larisa Baiazitova.

## Prohlášení

„Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma Studium migrace mesenchymálních kmenových buněk na principu chemotaxe jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne .....

.....

podpis autora

## **Poděkování**

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Larise Baiazitove za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při experimentální části této práce.

V Brně dne .....

.....

podpis autora

# Obsah

Seznam obrázků .....	IX
Seznam tabulek .....	XI
ÚVOD .....	1
TEORETICKÁ ČÁST .....	2
1. KMENOVÉ BUŇKY .....	2
1.1. Využití kmenových buněk .....	2
1.2. Mesenchymální kmenové buňky .....	3
1.2.1. Izolace MSC .....	4
1.2.2. Využití MSC .....	8
2. MIGRACE BUNĚK .....	9
2.1. <i>In vitro</i> studie .....	11
2.1.1. Dunnova komůrka .....	11
2.1.2. 3D Chemotaxe v kolagenovém gelu .....	12
2.1.3. <i>μ-Slide Chemotaxis</i> .....	14
2.1.4. Boydenova komůrka .....	16
2.1.5. <i>Transwell</i> migrační testy .....	16
2.2. Klinické studie migrace buněčné linie MSC .....	18
2.2.1. <i>Transwell</i> test migrace MSC z tkáně rakoviny prsu .....	18
2.2.2. Experimentální a klinické aplikace MSC u míšního poranění .....	18
2.2.3. Migrace MSC na místo akutního infarktu myokardu .....	19
2.2.4. Léčba intrakraniálního aneurysmatu pomocí MV MSC .....	20
3. CHEMOATRAKTANTY .....	21
3.1. Růstový faktor odvozený z krevních destiček .....	21
3.1.1. Studie s použitím PDGF .....	22
3.2. Fetální bovinní sérum (FBS) .....	22
4. KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE .....	23
4.1. Fluorescence .....	23
4.1.1. Fluorescenční barviva .....	24
4.2. Princip laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu .....	25
4.2.1. Detekce signálu .....	26

4.3.	Výhody a nevýhody konfokální mikroskopie.....	27
4.4.	Multi-fotonová fluorescenční mikroskopie .....	28
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....		30
5.	PRÁCE S BUNĚČNOU LINÍÍ.....	30
5.1.	Potřebné vybavení a použitý materiál.....	30
5.2.	Kultivace a pasážování buněčné linie MSC .....	31
5.3.	Koncentrace buněk.....	31
5.3.1.	Příklad výpočtu .....	32
5.4.	Barvení buněk .....	32
6.	BUNĚČNÁ MIGRACE .....	34
6.1.	<i>μ-Slide Chemotaxis</i> .....	34
6.1.1.	Protokol pro nasazení buněk.....	34
6.1.2.	Kontrola adheze buněk .....	35
6.1.3.	Aplikace chemoatraktantu.....	35
6.1.4.	Kontrolní experimenty.....	36
6.2.	<i>Transwell</i> migrační test.....	37
6.2.1.	<i>Transwell</i> I.....	37
6.2.2.	<i>Transwell</i> II .....	38
6.2.3.	<i>Transwell</i> III a IV.....	39
7.	SBĚR A ZPRACOVÁNÍ DAT .....	40
7.1.	Zpracování obrazů.....	40
7.1.1.	Počet pórů v obraze.....	40
7.1.2.	Počet jader .....	41
7.1.3.	Výpočet konfluence .....	42
8.	VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ.....	47
8.1.	Vyhodnocení pomocí počtu pórů.....	47
8.2.	Vyhodnocení pomocí konfluence.....	48
8.3.	Vyhodnocení pomocí počtu jader buněk .....	48
8.4.	Výsledky experimentů .....	49
8.4.1.	Výsledky <i>μ-Slide Chemotaxis</i> .....	49
8.4.2.	Výsledky <i>Transwell</i> I .....	50
8.4.3.	Výsledky <i>Transwell</i> II.....	51



8.4.4. Výsledky <i>Transwell</i> III .....	53
8.4.5. Výsledky <i>Transwell</i> IV.....	55
8.5. Optimalizace použitých metod .....	56
ZÁVĚR .....	58
Použitá literatura.....	60
Seznam zkratk a veličin .....	64
Seznam příloh .....	66

# Seznam obrázků

Obr. 1: MSC izolovány z pupečnickové šňůry, zvětšení 100x [19] .....	4
Obr. 2: Izolace MSC z tukové tkáně; převzato z [33] a upraveno.....	6
Obr. 3: Mechanismus buněčné migrace; převzato z [30] .....	10
Obr. 4: Přehled hlavních metod studia buněčné migrace [5] .....	11
Obr. 5: Schéma Dunnovy komůrky [8] .....	12
Obr. 6: Komůrka pro 3D chemotaxi; převzato z [2] a upraveno .....	13
Obr. 7: A – buňky před trasováním, B – trajektorie buněk po trasování [2] .....	14
Obr. 8: A – celková konfigurace <i>μ-Slide Chemotaxis</i> [10]; 1) – 3) pracovní sklíčka, 4) zátky, 5) víčko; B – 1) pozorovací oblast, 2) levá komora, 3) pravá komora, A) – B) plnicí porty s postranní štěrbinou, D) – F) plnicí porty; .....	15
Obr. 9: A - schéma vytvoření hydrogelové bariéry a migrace buněk po směru gradientu chemoatraktantu, B - snímek keratinocytů z fázově-kontrastní video-mikroskopie v čase 0 a 20 hodin, s gradientem TGF $\alpha$ [15] .....	16
Obr. 10: Schéma Boydenovy komůrky [18] .....	16
Obr. 11: Princip fluorescence; převzato z [40] a upraveno.....	24
Obr. 12: Schéma konfokální mikroskopie, převzato z [35] a upraveno .....	26
Obr. 13: Srovnání rozlišení standardní (vlevo) a konfokální mikroskopie (vpravo); na obrázku je neuronová síť myši mozkové tkáně [39].....	28
Obr. 14: Mřížka Bürkerovy komůrky [51] .....	32
Obr. 15: Excitační a emisní spektrum barviva CMFDA green [16] .....	33
Obr. 16: Excitační a emisní spektrum barviva DAPI [41] .....	33
Obr. 17: Nasazení buněk (vlevo), výška kapaliny v plnicích portech (vpravo) .....	34
Obr. 18: Odstranění neadherovaných buněk [10] .....	35
Obr. 19: Aplikace chemoatraktantu [10] .....	36
Obr. 20: Obsah rezervoárů během experimentu [10] .....	37
Obr. 21: Obsah jamek v experimentu <i>Transwell</i> I .....	38
Obr. 22: Obsah jamek v experimentech <i>Transwell</i> II – IV; A – negativní kontrola; B – pozitivní kontrola; C – aktivní chemoatraktant PDGF-BB.....	38
Obr. 23: Vývojový diagram funkce <i>Nalezení_poru</i> .....	44
Obr. 24: Vývojový diagram funkce <i>Nelezení_jader</i> .....	45
Obr. 25: Vývojový diagram funkce <i>Vypocet_konfluence</i> .....	46
Obr. 26: Příklad detekce pórů v porézní membráně (póry vyznačeny červeně); na obrázku výsledek detekce z experimentu <i>Transwell</i> III.....	47
Obr. 27: Příklad vyhledávání buněk v obraze; původní obraz z konfokálního mikroskopu (vlevo), nalezené oblasti buněk pro výpočet konfluence (vpravo) .....	48
Obr. 28: Příklad detekce jader; původní obraz z konfokálního mikroskopu (vlevo), detekovaná jádra (vpravo) .....	49

Obr. 29: Graf vyhodnocení počtu pórů <i>Transwell</i> I; vlevo zobrazen počet pórů po 24 hodinách, vpravo po 48 hodinách .....	50
Obr. 30: Graf vyhodnocení počtu pórů <i>Transwell</i> II; v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách .....	52
Obr. 31: Graf vyhodnocení počtu pórů <i>Transwell</i> III, v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách .....	53
Obr. 32: Graf vyhodnocení počtu jader <i>Transwell</i> III.....	54
Obr. 33: Graf vyhodnocení počtu pórů <i>Transwell</i> IV, v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách .....	55
Obr. 34: Graf vyhodnocení počtu jader <i>Transwell</i> IV .....	56
Obr. 35: 3D rekonstrukce buňky pomocí softwaru mikroskopu LAS X.....	57

# Seznam tabulek

Tab. 1: Počet pórů a jejich rozdíl v experimentu <i>Transwell</i> I po 24 a 48 hodinách .....	50
Tab. 2: Konfluence buněk v experimentech <i>Transwell</i> I po 24 a 48 hodinách .....	51
Tab. 3: Konfluence experimentu <i>Transwell</i> II po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány .....	53
Tab. 4: Konfluence experimentu <i>Transwell</i> III po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány .....	54
Tab. 5: Konfluence experimentu <i>Transwell</i> IV po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány .....	56

# ÚVOD

Schopnost buněk migrovat, růst a adherovat je primárně regulována externími signály. Jedním z případů buněčné migrace v reakci na vnější podněty je chemotaxe, tj. směrový pohyb buněk podle koncentračního gradientu. Chemotaxe se podílí na celé řadě fyziologických a patologických jevů. Proto je její reprodukce v *in vitro* podmínkách důležitým milníkem pro pochopení chování jak jednotlivých buněk, tak organismu jako celku. [1] [2]

V posledních letech až desetiletích probíhá stále více rozsáhlých studií s cílem přesně pochopit buněčnou odpověď na různé chemické gradienty, které vznikají působením specifických látek. Důležitým faktorem pro *in vitro* experimenty je dosažení co nejpřesnějších fyziologických podmínek, dostatečné a trvalé působení gradientu a současně možnost sledovat dynamické chování buněk. [1] [2] Nicméně buněčná migrace je ve skutečnosti komplikovaný proces a proto musíme brát v úvahu fakt, že tyto *in vitro* podmínky jsou poněkud zjednodušené a výsledky nemusí zcela odpovídat chování buněk v organismu. Přesto studium migrace buněk umožňuje mimo jiné vývoj nových diagnostických a terapeutických přístupů. Zaměřují se na zvýšení efektivity diagnostiky, léčby a prevence mnoha onemocnění. [5]

Všechny typy buněk však na změnu chemického gradientu nereagují stejně. Pro účely této diplomové práce byly použity mesenchymální kmenové buňky, nebo také mesenchymální stromální buňky (dále MSC, z angl. *Mesenchymal stem cells*). MSC nejsou zcela diferencované, řadí se k dospělým kmenovým buňkám a mají relativně velký potenciál na další proliferaci. Díky tomu mají tendenci migrovat určitým směrem nebo nahrazovat poškozenou tkáň. MSC byly objeveny v druhé polovině minulého století a od té doby bylo experimentálně prozkoumáno mnoho jejich vlastností. Původně byla jejich izolace možná pouze z kostní dřeně. Později se jejich výskyt prokázal v perivaskulární tkáni, která obklopuje cévy. Díky tomu je poměrně snadné buňky izolovat z dobře prokrvené tkáně. Následující výzkum potvrdil jejich výskyt v mnoha dalších tkáních, včetně tukové. Díky její dobré dostupnosti a jednoduchému odběru je v současné době právě tuková tkáň jednou z nejvíce používaných zdrojů pro MSC. [3]

V této diplomové práci se zaměříme na zdroje a možnosti izolace MSC a také na klinické a experimentální studie, které byly v posledních letech upravovány a optimalizovány tak, abychom získávali co nejlepší výsledky. Na základě těchto studií je založena experimentální část této práce. Protokol na migraci MSC byl také několikrát optimalizován tak, aby bylo dosaženo požadovaných výsledků. Na začátku bylo cílem prokázat migraci MSC na principu chemotaxe za použití  $\mu$ -Slide Chemotaxis. Tento princip se ukázal jako nevhodný vzhledem k malé koncentraci buněk a jejich poměrně velkým rozměrům. Následně byl tedy využitý migrační test *Transwell*. Velikost buněk zde také hrají roli, nicméně jak se ukázalo, migraci buněk směrem k vyšší koncentraci chemoatraktantu tímto způsobem lze prokázat.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. KMENOVÉ BUŇKY

Buňky musí splňovat dvě kritéria, abychom je mohli nazývat kmenovými buňkami. Musí být schopné sebeobnovy a musí být schopné diferencovat se a vytvářet tak všechny typy specializovaných buněk nacházející se v lidském organismu. Kmenové buňky mají původ jak v dospělé tkáni, tak v embryonálních buňkách. Existují tři typy – dospělé kmenové buňky, embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky. [4]

Dospělé kmenové buňky už se nemohou diferencovat na jakoukoli specializovanou buňku. Mají za úkol reparaci a náhradu specializované poškozené tkáně. Mohou tedy vytvořit pouze buňky konkrétní tkáně, ve které se nacházejí. Mohli bychom říct, že tyto kmenové buňky udržují organismus zdravý a zabraňují předčasnému stárnutí. Naproti tomu embryonální kmenové buňky, které jsou přítomny jen v nejranějších stádiích lidského života, mají schopnost diferencovat se do všech tkání a vytvořit tak jakoukoli specializovanou buňku. Indukované pluripotentní kmenové buňky jsou speciálním případem a kombinací obou předchozích. Mají vlastnosti embryonálních kmenových buněk, takže jsou schopné diferencovat se do mnoha specifických tkání. Vyskytují se však i u dospělého jedince. Vědci také pracují na způsobech vývoje kmenových buněk z jiných buněk pomocí genetických technik „přeprogramování“. [4] [12]

### 1.1. Využití kmenových buněk

Lidský organismus má přirozenou schopnost reparace poškozené tkáně díky populaci kmenových buněk, které všichni máme. Nicméně jejich počet a schopnost opravy jsou omezené, proto jejich přirozená aktivace v organismu není v mnoha případech pro uzdravení dostačující.

Transplantované kmenové buňky by bylo možné využít díky jejich přirozeným schopnostem nahradit nemocné nebo staré buňky pro terapii různých zdravotních problémů, onemocnění či zranění, které jsou v současné době neléčitelné. Léčba by také byla v mnoha případech přirozenější. Pacientům by se podávaly jejich vlastní kmenové buňky nebo specializované buňky diferenciované z kmenových. Tím by bylo možné například výrazně omezit jejich odmítnutí organismem. V současné době musí být pacient zapsán na transplantační list a čekat na vhodného dárce. S využitím kmenových buněk by tomu tak nemuselo být – vhodnou stimulací a růstem by se mohla vypěstovat specifická tkáň schopná nahradit původní orgán bez nutnosti dlouhé čekací doby na transplantaci. Vědci již použili kmenové buňky pro vytvoření nové kožní tkáně. To je významný pokrok pro léčbu těžkých popálenin nebo rozsáhlých povrchových zranění. Další využití je potenciálně možné v mnoha dalších odvětvích medicíny, jako je náhrada

poškozených buněk srdce při ischemii, léčba Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby nahazováním poškozených buněk mozku a mnoho dalších. [11] [12]

Využití lze nalézt nejen pro terapeutické účely, ale také pro vědecké výzkumy. Vědci například zjistili, že „zapnutí“ nebo „vypnutí“ konkrétního genu může způsobit jeho diferenciaci. Tyto znalosti pomáhají při studiu různých typů genů a mutací – co ve skutečnosti způsobují a jaké následky mají na organismus.

Nicméně i když se použití kmenových buněk zdá snadné, stále stojíme před mnoha reálnými problémy a překážkami, kvůli kterým je zatím nelze běžně využívat v klinické praxi. Potenciálně totiž mohou tyto buňky překročit proliferační mez a vytvořit nekontrolovatelné nádorové bujení. I přes to, že se jedná o vlastní pacientovy buňky, mohou být také napadeny imunitním systémem. V neposlední řadě stojíme před etickým problémem, zda je využití kmenových buněk (zejména embryonálních) společensky přijatelné. Odebírání embryonálních kmenových buněk se totiž provádí při *in vitro* fertilizaci. Tento problém se zdá být vyřešen díky dostupnosti např. právě MSC, které se řadí mezi dospělé kmenové buňky a jejich izolace není v tomto ohledu překážkou. [11] [12]

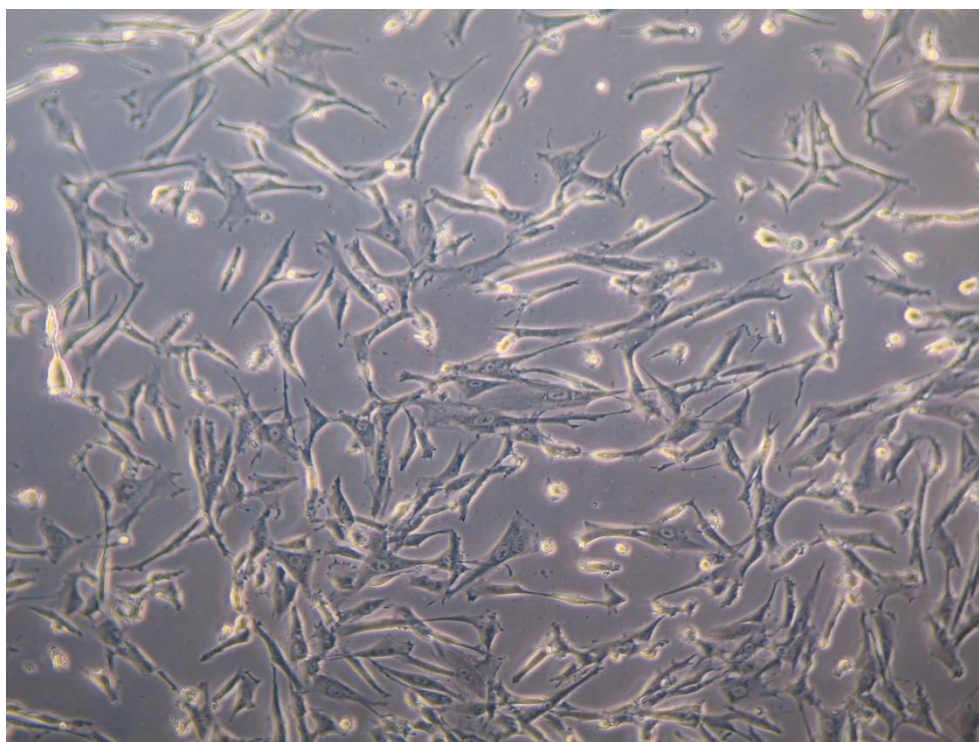
## **1.2. Mesenchymální kmenové buňky**

MSC jsou mesenchymální stromální kmenové buňky a řadí se k dospělým kmenovým buňkám. Pocházejí z pojivové tkáně nebo ze stromu, které obklopuje tkáně a orgány. Nacházejí se především v kostní dřeni, ale najdeme je i v bohatě prokrvené nebo tukové tkáni. Ta je výhodná pro jejich odběr, protože zdrojem těchto MSC může být i „odpadní“ tuková tkáň po liposukci. V kostní dřeni dospělého jedince je poměr MSC ze všech jaderných buněk asi 0,001 – 0,01% [13]. Když byly tyto multipotentní buňky izolovány, prokázalo se, že jsou schopny diferencovat do buněk mesenchymální linie, jako osteocyty, chondrocyty, myocyty, včetně kardiomyocytů, adipocyty a stromální buňky kostní dřeně. MSC mají tedy obrovský terapeutický potenciál pro regeneraci a reparaci tkáně. [4]

Morfologicky mají mesenchymální kmenové buňky dlouhá těla s velkým jádrem a podobají se tak fibroblastům. Jsou charakterizovány svou schopností sebeporace a přilnavosti k plastu. Mají schopnost exprese povrchových molekul CD105, CD73 a CD90. [13] Na obrázku je zobrazena fotografie MSC pořízená z optického mikroskopu s viditelnou adhezí na plast kultivační lahve (viz Obr. 1).

MSC lze klinicky použít k reparaci a regeneraci poškozených tkání. Izolovaných buněk, které lze získat od dárce, je však omezený počet a je jich výrazně méně než počet potřebný pro regeneraci tkáně. Proto existuje celá řada technik, jak mohou být MSC izolovány, pěstovány a diferencovány. Nezbytnou složkou vyživovacího media, použitého při experimentech, jsou růstové faktory. Podporují totiž proliferaci, vitalitu MSC i diferenciaci vůči specifické tkáni. Ukázalo se například, že růstový faktor TGF-beta 3 (cytosin regulující imunitní funkce a proliferaci) zvyšuje proliferační schopnost MSC a současně indukuje chondrogenézi. Podobně kostní morfogenetický protein 3 (BMP-3)

zvyšuje proliferaci MSC a současně vyvolává osteogenezi. Výběr specifického růstového faktoru tedy výrazně ovlivní expanzi a diferenciaci MSC směrem k požadované buněčné linii. [4]



Obr. 1: MSC izolovány z pupečnickové šňůry, zvětšení 100x [19]

### 1.2.1. Izolace MSC

Bez ohledu na metodu izolace by MSC měly splňovat určitá kritéria. Ta jsou navržená Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (ISCT, z angl. *International Society for Cellular Therapy*) následovně. Za prvé, MSC jsou adherentní buňky schopné přilnout k plastu, pokud jsou udržovány ve standardních kultivačních podmínkách. Za druhé, MSC by měly exprimovat markery CD105, CD73, CD90 a naopak by neměly exprimovat CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79-alpha a CD19. Za třetí, MSC by měly být schopny při *in vitro* podmínkách diferenciaci do osteoblastů a adipocytů. [31]

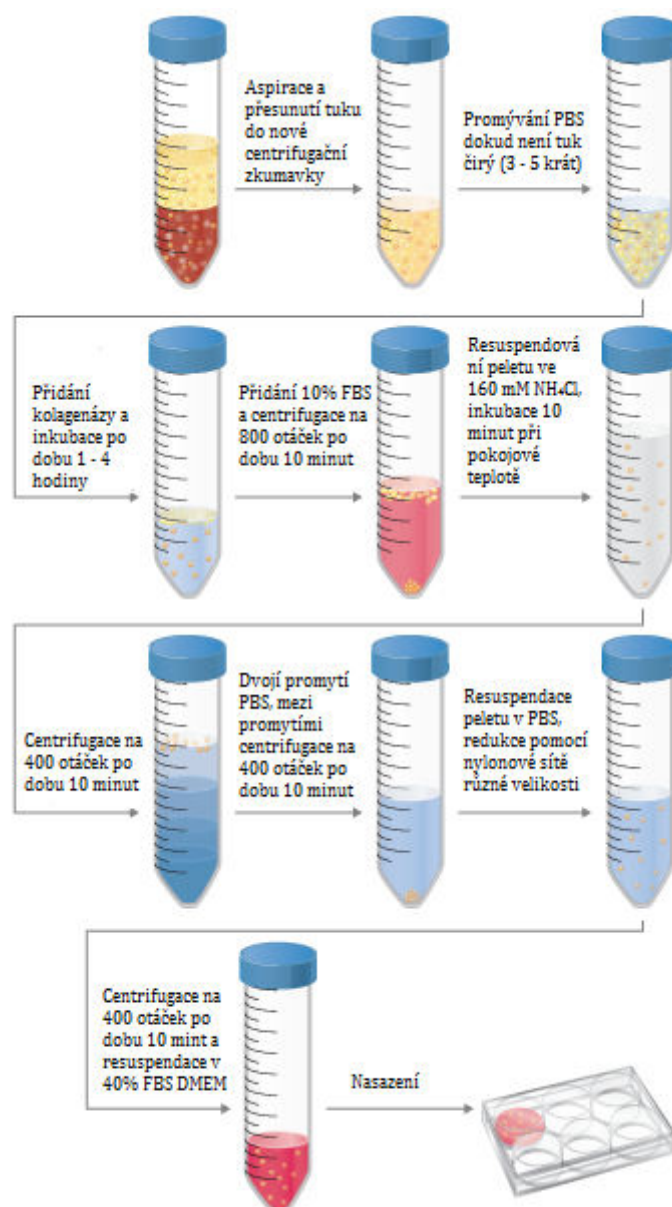
MSC se relativně snadno izolují z různých typů tkání, jako je například tuková tkáň, periferní krev, pupečnicková krev nebo kostní dřeň. Jejich primárním zdrojem je právě kostní dřeň. Důležitou vlastností pro izolaci MSC izolovaných z kostní dřene (dále jen BM-MSC, z angl. *Bone marrow mesenchymal stem cells*) je schopnost adheze k plastovému povrchu nádoby, ve které se buňky kultivují. Odběr kostní dřene provádí lékař tenkou odběrovou jehlou z dutin v zadních hrbolech pánevních kostí odebráním malého množství dřene i s krví. Získaná kostní dřeň je přemístěna do zkumavky a centrifugací je izolován tzv. *buffy coat* (tvoří asi 1% celkového objemu krve a je tvořen zejména leukocyty a trombocyty, po centrifugaci se nachází mezi erytrocyty a plazmou). Ten je dále suspendován s PBS (fosfátový pufr) a kultivován. Dalším odstředěním se odstraní buňky na rozhraní a suspenze je promyta sterilním PBS. Buňky jsou dále kultivovány za standardních podmínek ve vhodném prostředí, kde postupně adherují.



Neadherované buňky se odstraní promytím PBS. K charakterizaci adherovaných buněk se využívá osteoblastické diferenciací medium. To je přidáno k těmto buňkám a sleduje se v průběhu několika týdnů, zda medium vyvolá diferenciaci MSC do osteoblastů. Pomocí průtokové cytometrie a vhodného softwaru lze dále analyzovat izolovanou suspenzi buněk. [31]

Při hledání nejvýhodnějšího zdroje kmenových buněk vědci zjistili, že tyto buňky obsahuje také tuková tkáň. Ta se navíc jeví jako ideální zdroj díky dobré dostupnosti (jak již bylo popsáno výše, MSC lze izolovat např. z odpadní tukové tkáně po liposukci) a poměrně snadné izolaci. Kmenové buňky z tukové tkáně již nemají tak vysokou diferenciací schopnost jako kmenové buňky z kostní dřeně, nicméně stále vykazují velmi dobré vlastnosti a dokážou se diferencovat na jiné buněčné linie. [32]

V následujícím textu je zjednodušenou formou popsána metoda využívající protokol MSC izolace z tukové tkáně – standardní izolace [33]. Nejprve se získaný tuk (asi 250 ml) přesune do nové zkumavky, kde se promývá 3–5krát PBS, dokud není tuk čirý. Poté se přidá kolagenóza a suspenze se inkubuje po dobu 1–4 hodin při vhodných podmínkách (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Dále se přidá 10% FBS (fetální bovinní sérum, z angl. *fetal bovine serum*) pro neutralizaci kolagenózy. Natrávený tuk se nyní centrifuguje na 800 otáček po dobu 10 minut. Plovoucí adipocyty, lipidy a nadbytečnou tekutinu je nutné odstranit, přičemž zůstane stromální vaskulární pelet. Ten se resuspenduje ve 160 mM NH<sub>4</sub>Cl a inkubuje po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté se opět centrifuguje na 400 otáček po dobu 10 minut, a když dojde k navrstvení suspenze, centrifuguje se na 1000 otáček po dobu 30 minut. Buňky se dvakrát promyjí PBS a mezi jednotlivými promytími se centrifugují na 400 otáček po dobu 10 minut. Po resuspendaci peletu v PBS se buňky filtrují přes nylonovou síť a opět se centrifugují. Poslední resuspendace je ve 40% FBS DMEM mediu (z angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) a takto získané buňky se nasadí na kultivační misku nebo lahev. Inkubuje se standardně při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> přes noc. Celá metoda je také znázorněna a popsána na obrázku níže (viz Obr. 2). Lze zvolit také mnohem rychlejší metodu, při které buňky nejsou tolik poškozené opětovnou centrifugací. Po přemístění krve s tukem do zkumavky se roztok centrifuguje na 400 otáček po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté se pelet resuspenduje v 160 mM NH<sub>4</sub>Cl a inkubuje po dobu 5 minut. Následuje centrifugace při 400 otáčkách po dobu 10 minut a po odstranění supernatantu se buňky resuspendují v 40% FBS DMEM, nasadí se na kultivační misku a inkubují se. [33]



**Obr. 2: Izolace MSC z tukové tkáně; převzato z [33] a upraveno**

Dalším způsobem izolace MSC je izolace z pupeční šňůry. Existují dvě hlavní techniky, a to štěpení enzymy a explantáty. Obecně se používají enzymy jako kolagenáza a hyaluronidáza, které pomalu tráví tkáň a tím způsobují uvolnění buněk z extracelulárního prostoru. Nevýhodou těchto protokolů je to, že enzymy je nutné inkubovat společně s tkání pupeční šňůry poměrně dlouhou dobu, až několik hodin. To však zvyšuje riziko degradace zdravých buněk tkáně. Protokoly zahrnující explantáty jsou efektivní a jednodušší než protokoly enzymatického štěpení, protože nevyžadují inkubaci s enzymy a efektivita závisí v podstatě pouze na schopnosti MSC migrovat z tkáně pupečníku a adherovat na povrch kultivační misky. Existuje však řada faktorů, které kvalitu izolace MSC ovlivňují, jako jsou velikost explantátů, typy kultivačních misek, na které buňky adherují a také další doplňkové látky přidávané do kultivačních

medií. Podle těchto faktorů se protokoly a studie optimalizují tak, aby byla efektivita izolace MSC z tkáně pupečníku co nejvyšší. Kultivační media téměř vždy obsahují FBS jako zdroj hormonů, růstových faktorů a dalších molekul potřebných k izolaci a expanzi MSC. FBS se někdy nahrazuje více fyziologickými variantami, jako je např. lidské sérum nebo sérum z pupečnickové krve (CBS, z angl. *Cord blood serum*). [46]

Jeden ze způsobů izolace MSC z explantátů pupeční šňůry probíhá následovně. Pupeční šňůra je odebrána ihned po porodu a přenesena do fyziologického roztoku (PBS) doplněného antibiotiky (penicilinem a streptomycinem). Po promytí v PBS jsou pupeční šňůry nařezány na pěti centimetrové segmenty. Ty jsou podélně naříznuty a jsou z nich odstraněny cévy. Segmenty se dále 7 dnů inkubují v kultivačním mediu, doplněném 10% FBS, ve vhodných podmínkách (37°C, zvlhčená atmosféra, 5% CO<sub>2</sub>). Po 14 dnech od začátku inkubace pupeční šňůry jsou odstraněny explantáty a v kultivačních nádobách zůstanou jen migrované adherentní buňky, které se nechávají expandovat, dokud nedosáhnou přibližně 80% konfluence. Poté se hodnotí morfologie izolovaných buněk pod mikroskopem. K oddělení buněk je následně použit trypsin a buňky jsou centrifugovány na 200 otáček po dobu 5 minut a znovu nasazeny do více jamkového pole s hustotou 10 000 buněk na jamku. Inkubovány jsou opět v živném mediu doplněném 10% FBS. Pasáž probíhá nejméně třikrát, aby byly ponechány jen životaschopné buňky. Aby bylo zjištěno, zda se jedná o požadované MSC, provádí se molekulární fenotypizace. Na konci třetí pasáže je z buněk extrahovaná RNA, pomocí PCR se provede reverzní transkripce pro detekci MSC specifických markerů včetně exprese CD44, CD90 a CD105 a elektroforézou na agarovém gelu mohou být produkty RT-PCR (z angl. *Reverse transcription polymerase chain reaction*, Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce) vizualizovány. Po přidání diferenciacních medií musí být buňky také schopny diferenciacce např. do adipocytů nebo osteoblastů. [46]

MSC lze izolovat v neposlední řadě také z rakovinné tkáně. Cílená léčba rakoviny má v dnešní době velký význam kvůli jejímu častému výskytu v populaci. Existuje řada studií, které dokládají přítomnost MSC např. v rakovinné tkáni kostního sarkomu, děložního hrdla, vaječníků a další. [28] Celkově tyto studie dokazují, že MSC v nádorových tkáních mohou být důležitým faktorem při modulaci proliferace a metastazování rakovinných buněk. V následujícím textu je popsána studie, ve které se úspěšně podařilo izolovat MSC z tkáně karcinomu prsu. Její výsledky potvrzují přítomnost MSC v této tkáni a dokazují souvislost proliferaci MSC s metastazováním nádorové tkáně.

Rakovinná tkáň byla získána od několika pacientek po mastektomii. Po odebrání byla tkáň promyta fyziologickým roztokem, rozřezána na malé segmenty o velikosti asi 1 mm<sup>3</sup> a kultivována v živném mediu obsahujícím 10% FBS, penicilin a streptomycin. Tkáňové vzorky byly takto inkubovány ve vhodných podmínkách s výměnou media každé tři dny. Po deseti dnech od inkubace tkáně začaly buňky podobné fibroblastům migrovat a adherovat na kultivační misku. Tyto buňky byly trypsinizovány a pasážovány do nové kultivační lahve. Po třetí pasáži byly buňky mimo jiné hodnoceny průtokovou

cytometrií, schopností diferenciací do osteoblastů a adipocytů a byly použity pro RT-PCR, kde se vyhodnocovala specifická exprese genů pro MSC. [28]

### **1.2.2. Využití MSC**

MSC představují potenciálně velký příslib pro biomedicínu a v následujících letech by mohly být využívány pro regenerativní medicínu. Využití přináší zejména pro buněčnou biologii a genovou terapii, kde se již dnes používají v celé řadě klinických studií. Vědci již použili MSC např. k vytvoření nových tkání, jako jsou kosti, chrupavky a tukové buňky. [11]

Aplikace MSC se využívá v neurologii a neurochirurgii při studiích poškození míchy, roztroušené sklerózy, mozkové mrtvice či Parkinsonovy choroby. [13] Dále také existují studie, které se snaží přijít na způsob nahrazení chirurgického zásahu při vzniku intrakraniálních aneurysmat podáním mikrověsikul odvozených z MSC. [47] Další využití nacházíme v oblasti kardiologie, kde bychom mohli být schopni regenerovat poškozenou tkáň např. po akutním infarktu myokardu. [14] Uplatnění nachází také v oblasti onkologie, kde MSC hrají důležitou roli při proliferaci a metastazování nádorové tkáně. [28] Vybrané studie jsou popsány níže v kapitole Klinické studie migrace buněčné linie MSC. Nicméně už nyní můžeme říct, že MSC by mohly jednoho dne hrát roli při řešení široké škály zdravotních problémů a onemocnění.

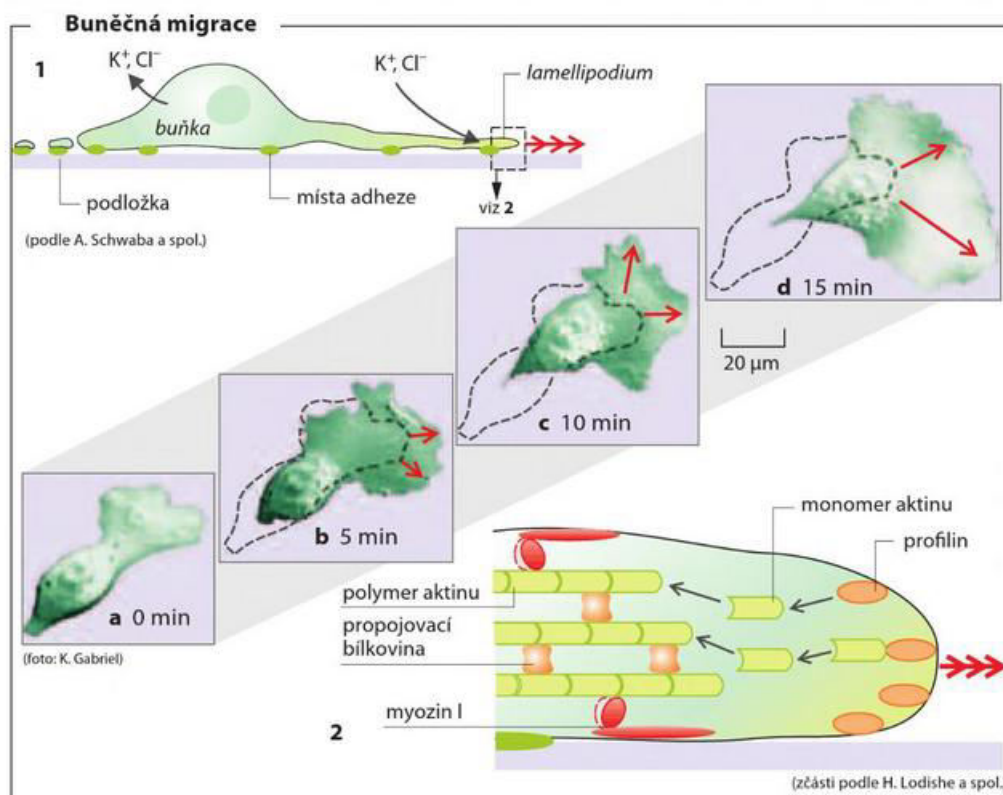
## 2. MIGRACE BUNĚK

Migrace a pohyb je základní buněčný proces, který se vyskytuje po celý život buňky, počínaje embryonálním vývojem a pokračující až do její smrti. U vyvíjejícího se embrya je migrace buněk hnacím faktorem různých vývojových stádií. Buňky ze zárodečného listu migrují na různá cílová místa, kde se stávají specifickými populacemi buněk vytvářející tkáň nebo orgány. U dospělých dochází k migraci během životně důležitých procesů, jako je obnova a reparace tkáně, přičemž staré nebo poškozené buňky jsou nahrazeny nově vytvořenými buňkami, které se na požadované místo dostaly díky schopnosti migrovat. Takové události jsou nezbytné pro zachování integrity tkáně a udržení homeostázy. Dále hraje migrace buněk důležitou roli při zprostředkování imunitní odpovědi organismu během infekcí, ve kterých fagocyty, například neutrofil, cirkulují v krevním řečišti a migrují do infikovaných tkání, kde ničí napadající patogeny. Zatímco na jedné straně je buněčná migrace životně důležitá pro udržení zdravé tkáně a homeostázy, na druhé straně migrace výrazně přispívá k patogenním stavům a onemocněním. [29]

Pokud různé typy buněk a organismů specificky reagují na působení chemických gradientů, tento jev se nazývá chemotaxe a má za následek pohyb buněk konkrétním směrem. Hraje důležitou roli ve fyziologických a patologických procesech, včetně vývoje organismu, infekčních a alergických chorob, hojení ran, angiogeneze, aterosklerózy, imunitní odpovědi a nádorového bujení. Příkladem chemotaxe je pohyb bílých krvinek do místa zánětu, v němž vznikají specifické látky (mediátory, chemokiny). Jak již bylo napsáno výše, chemotaxe je směrový pohyb buněk. Této výhody využíváme při jejich navigaci, kdy buňky vystavíme chemickému gradientu pouze určitým směrem a pozorujeme, jak na tuto změnu dynamicky reagují. Můžeme ji ale sledovat pouze po dobu působení gradientu. Po dosažení stavu rovnováhy už buňky nemají vnější podnět, a tedy nemigrují konkrétním směrem. Mohou se ovšem pohybovat i náhodně. Tento pohyb se nazývá chemokineze a v této práci se jím nebudeme zabývat. [1] [2]

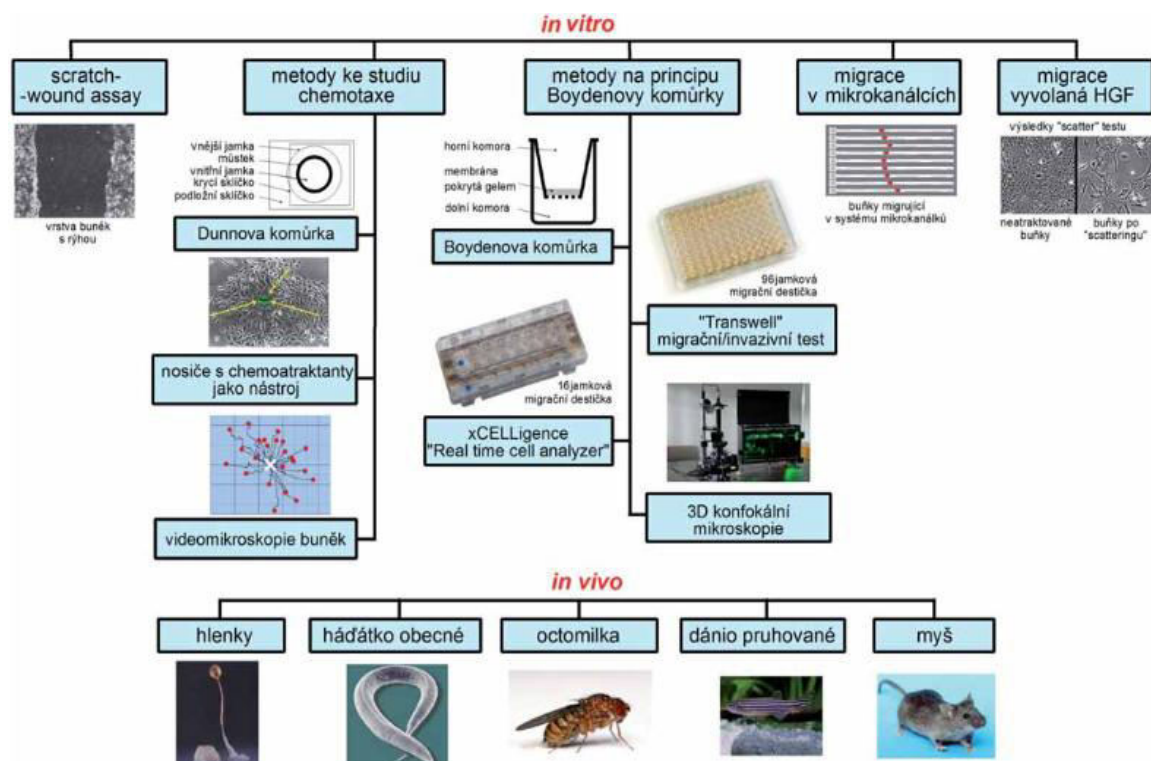
Jaký je tedy samotný mechanismus pohybu buňky nebo skupiny buněk? Je to cyklický proces, který zahrnuje polarizaci buňky v reakci na vnější signály, rozšíření filopodiálních nebo lamellipodiálních výčnělků, kterými buňka adhezuje k matrici a působením tažných sil generovaných adhezí se posouvá kupředu. Mechanismus pohybující se buňky je následující. Nejdříve dochází v zadní části buňky k depolymerizaci aktinu a tubulinu cytoskeletu a současně k endocytóze malých částí buněčné membrány. Tyto endocytované váčky membrány intracelulárně transportuje směrem dopředu. V lamellipodiálních výčnělcích vepředu buňky se polymerizuje aktin a spolupůsobením myozinu v plazmatické membráně se za spotřeby ATP posouvá buňka směrem kupředu. Váčky buněčné membrány v intracelulární tekutině jsou mezitím přemístěny do přední části buňky a znovu jsou zde zabudovány do buněčné membrány. Poté dochází k adhezi buněčné membrány k matrici, na které se buňka nachází. Adhezní síly zde působí jako napínací nebo tažné síly, díky kterým se buňka „tlačí“ dopředu. Tyto

napěťové síly jsou vytvářeny díky interakci svazků aktinových a myosinových vláken. Celý tento proces způsobuje „růst“ buňky do přední strany a „úbytek“ na její zadní straně. Celý mechanismus pohybu buňky je znázorněn na obrázku níže (viz Obr. 3). [29] [30]



**Obr. 3: Mechanismus buněčné migrace; převzato z [30]**

Migrační schopnosti buňky závisí na síle adheze, která je ovlivněna faktory, jako je hustota ligandu a receptorů a také afinita mezi ligandy a receptorem. Například buňky s velkou adhezní silou jsou vysoce přilnavé, a proto tolik nemigrují nebo se pohybují pomalu. Některé buňky mají také schopnost invaze, tedy migrace zahrnující pohyb buněk extracelulární matrix do sousedních tkání. [29] V následujícím textu budou popsány některé studie zabývající se různými způsoby chemotaxe *in vitro*. Kromě 2D experimentů s adherentními buňkami se zaměříme také na 3D metodu sledování pohybu buněk. Na Obr. 4 vidíme schéma nejvíce používaných metod pro studium buněčné migrace v *in vitro* a *in vivo* podmínkách.



Obr. 4: Přehled hlavních metod studia buněčné migrace [5]

## 2.1. In vitro studie

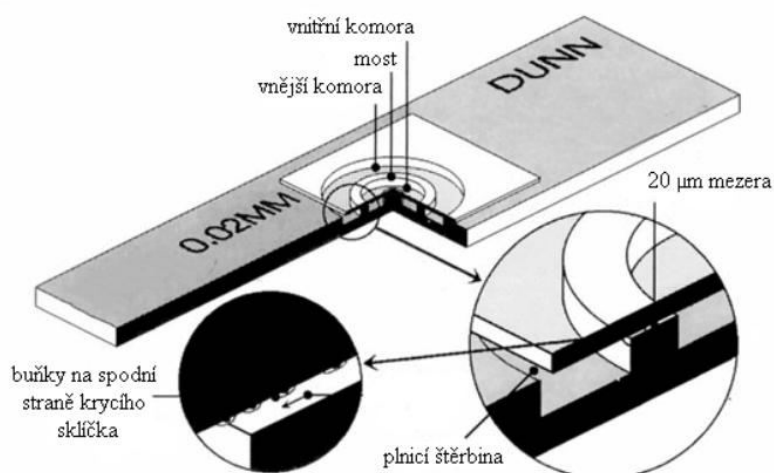
*In vitro* migrační studie a testy mohou výrazně pomoci k získávání znalostí o principech směrového pohybu buněk směrem ke stimulu. Slouží zejména jako modelové systémy pro měření tohoto pohybu buněk, kde je stimul stanoven různou koncentrací chemoatraktantu. Nyní si popíšeme několik významných principů a studií, které jsou dnes v této oblasti hojně využívány.

### 2.1.1. Dunnova komůrka

Tato technika byla vytvořena pro studium buněčných signálních drah a následných změn v buněčné adhezi a morfologii, které jsou nezbytné pro to, aby byla buňka schopna reagovat na podnět (chemoatraktant) a zahájit tak buněčnou odpověď. V této komůrce jsou známy velikost i směr gradientu. To umožňuje sledovat pomalu pohybující se buňky po delší dobu.

Dunnova komůrka se skládá ze dvou soustředných kruhů, které jsou v tenkém sklíčku. Označují se jako vnitřní a vnější komůrka. Tyto komůrky jsou odděleny tzv. mikrofluidním mostem, který je o 20  $\mu\text{m}$  nižší než sklíčko. Vzniká zde štěrbina, kterou mohou buňky prostoupit (viz Obr. 5). Vnitřní komůrka obsahuje chemoatraktant zatímco vnější ne. Difúzí zde vzniká lineární gradient chemoatraktantu a na jeho základě migrují buňky požadovaným směrem, tedy z vnější komůrky po můstku vedoucím do vnitřní komůrky. Mikroskopem jsou pozorovány a zaznamenávány buňky, které se pohybují přes můstek. Výsledek může být následně zpracován vhodným softwarem. [5] [6] [8]

Dunnova komůrka byla úspěšně použita v několika studiích chemotaxe a přispívá tak k lepšímu pochopení buněčné odpovědi na chemický podnět. Během experimentů bylo využito např. odpovědi fibroblastů na růstový faktor obsažený v trombocytech nebo odpověď neutrofilních granulocytů na interleukin-8 (nebo také neutrofil aktivující peptid s chemotaktickým účinkem, který je odpovědný za řízenou migraci leukocytů z krevního řečiště do okolních tkání [7]). [8]



Obr. 5: Schéma Dunnovy komůrky [8]

### 2.1.2. 3D Chemotaxe v kolagenovém gelu

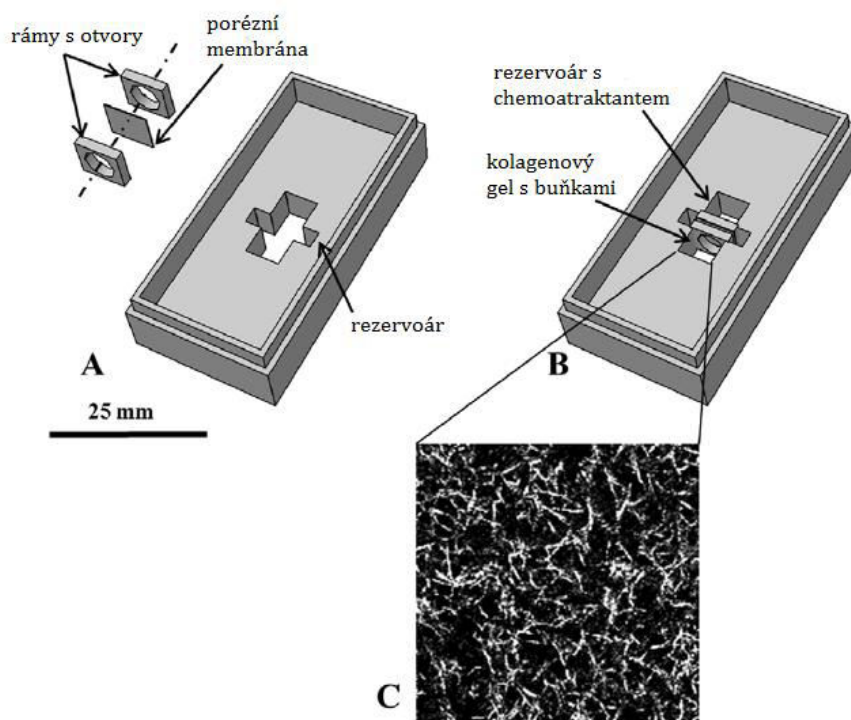
I přes to, že bylo prokázáno mnoho souvislostí různých patologických procesů s chemotaxí, není tento princip zcela pochopen. Jedním z důvodů je složitost a komplexnost systémů, ve kterém se buňky nacházejí – 3D prostředí, které není snadno reprodukovatelné *in vitro*. Snahou je co nejvíce se přiblížit fyziologickým podmínkám a to vedlo k vytvoření studií, které pracují s 3D prostorem, vytváří lineární a časově stabilní gradienty. Takto se začaly vyvíjet difúzní komory.

V této poměrně nové studii je stanoven gradient difúze uvnitř porézního gelu nebo skrz malou mezeru mezi dvěma velkými rezervoáry obsahujícími chemoatraktanty s různou koncentrací. Chemotaxe probíhá v 3D kolagenových gelech umístěných v komůrce, kterou lze použít opakovaně a lze ji propojit s časosběrnou video-mikroskopií. Koncentrační gradient chemoatraktantu v kolagenovém gelu, ve kterém jsou nasazeny buňky, vzniká díky působení difúzní síly přes porézní membránu. Výhodou této techniky je možnost srovnání chemotaxe, tedy kontrolovaného pohybu buněk, s náhodným pohybem bez přítomnosti jakéhokoli koncentračního gradientu, a to se stejnými buňkami v rámci jednoho experimentu. Pro tuto studii byly použity neutrofilie a interleukin-8 (dále jen IL-8), které byly získány od lidských dárců. Buňky byly izolovány sedimentací a následnou centrifugací, kde se oddělily od erytrocytů. [2]

Samotná komůrka se skládá z jednoho hliníkového bloku. Porézní membrána obsahuje póry o velikosti 0,22 mm a je uložena mezi dvěma kovovými rámy s otvory o průměru 4 mm. Membrána odděluje dvě části – jedna obsahuje kolagenový gel



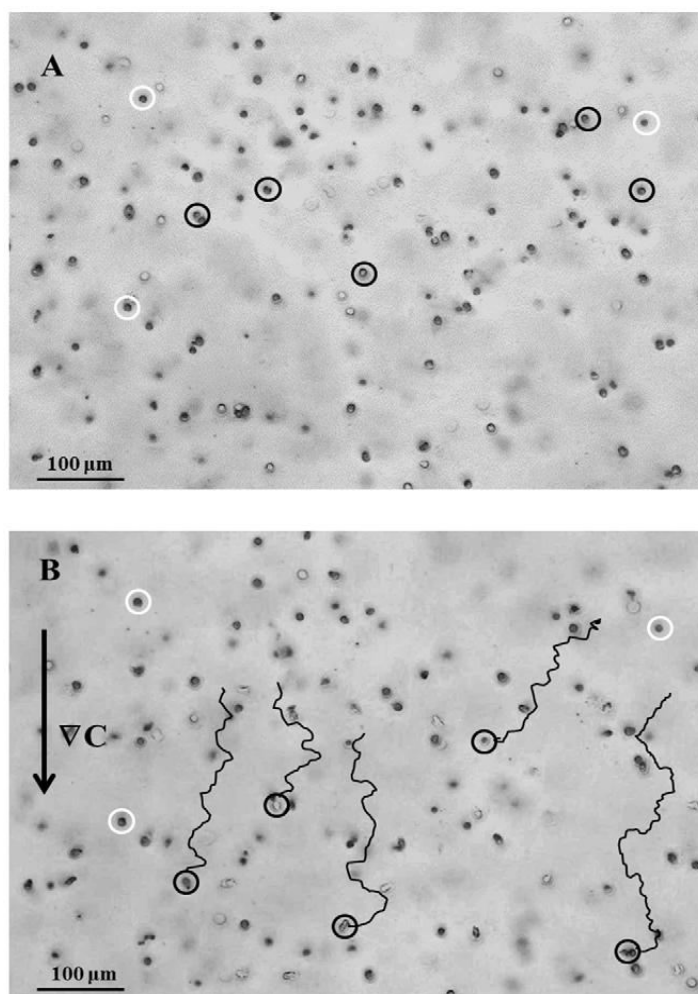
s nasazenými buňkami a druhá slouží jako rezervoár pro roztok chemoatraktantu. Během experimentu chemoatraktant difunduje přes tuto membránu, čímž vytváří požadovaný koncentrační gradient v kolagenovém gelu. [2]



Obr. 6: Komůrka pro 3D chemotaxi; převzato z [2] a upraveno

Na obrázku 6A vidíme komůrku v rozloženém stavu, kde jsou zvýrazněny některé komponenty – rámy s otvory nebo porézní membrána. V další části obrázku 6B vidíme komůrku se všemi částmi uvnitř, kde rámy oddělují jednotlivé části rezervoáru a membrána je umístěna uprostřed (viz Obr. 6). Průběh experimentu je následující. 30 minut po zahájení snímání obrazů je přidán roztok  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  IL-8 do rezervoáru pro chemoatraktant. Díky tomu je možné kvantifikovat buněčnou migraci před přidáním chemoatraktantu i po jeho přidání, tedy po stanovení koncentračního gradientu.

Pohyb buněk je snímán a následně zpracován offline analýzou obrazu. Vzorek byl snímán každou minutu po dobu 110 minut a manuálně byla sledována trasa 70 buněk. Výsledky jsou vyjádřeny chemotaktickým indexem, rychlostí pohybu a trajektorie buněk je rekonstruována softwarem. Na Obr. 7 vidíme vyznačené buňky v kruzích ve dvou různých časech (čas v A = 0 min., čas v B = 110 min.). Obr. 7B je získaný z pěti po sobě jdoucích zaostřených snímků s vyznačenou trajektorií buněk. Šipka ukazuje směr koncentračního gradientu. Mikroskop pro snímání je vybaven vysoce citlivou chlazenou CCD kamerou a motorizovaným stolem, zaostřovací a filtrační technikou pro automatické časosběrné snímání. Tento experiment lze sledovat také fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopem. Řízen je ovládacími prvky přes softwarové prostředí Labview. [2]

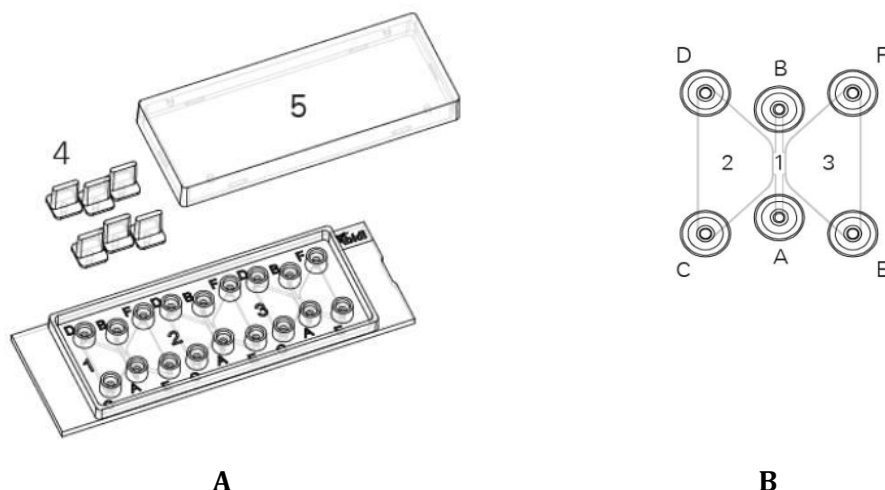


Obr. 7: A - buňky před trasováním, B - trajektorie buněk po trasování [2]

### 2.1.3. $\mu$ -Slide Chemotaxis

$\mu$ -Slide Chemotaxis je nástroj využívaný pro pozorování migrace buněk, které jsou vystaveny různým chemickým gradientům. Funguje jak pro adherentní buňky na 2D povrchu, tak pro buňky vložené v 3D gelové matrici. V experimentální části se budeme více zabývat právě touto 2D metodou. Její princip je popsán v této kapitole.

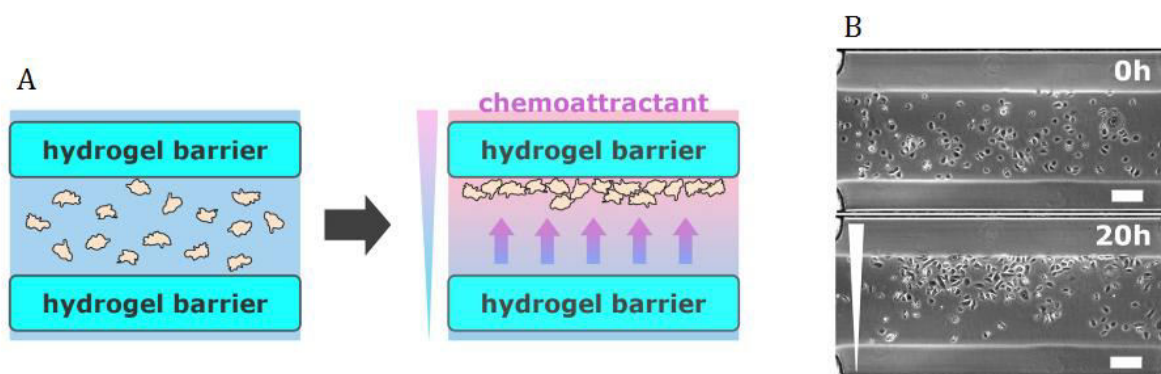
Dvě komory (Obr. 8 - 2 a 3) jsou spojeny malou štěrbinou (1). Pokud tyto komory obsahují různé koncentrace chemoatraktantů, případně chemoatraktant obsahuje pouze jedna z nich, ve štěrbině vznikne lineární gradient jejich koncentrací. Buňky umístěné ve štěrbině (v pozorované oblasti) jsou vystaveny těmto lineárním koncentračním gradientům a dochází k jejich migraci daným směrem. V ustáleném stavu, bez přidaného chemoatraktantu, je uvnitř komor a štěrbiny homogenní koncentrace a buňky nemají žádný specifický směr migrace. [10]



**Obr. 8: A – celková konfigurace  $\mu$ -Slide Chemotaxis [10]; 1) – 3) pracovní sklíčka, 4) zátky, 5) víčko; B – 1) pozorovací oblast, 2) levá komora, 3) pravá komora, A) – B) plnicí porty s postranní štěrbinou, D) – F) plnicí porty;**

Experimenty, při kterých jsou zkoumány pomalu se pohybující buňky, vyžadují dlouhý pozorovací čas v rozsahu 12 – 24 hodin. Tím lze zajistit větší spolehlivost a co možná nejpřesnější fyziologické podmínky při měření chemotaxního chování buněk. Tento požadavek  $\mu$ -Slide Chemotaxis splňuje – buňky jsou nasazeny v pozorovací oblasti a jsou vystaveny působení chemického gradientu, který je poměrně stabilní po dobu až 24 hodin. [15]

Tato technologie byla použita při studii pro vyhodnocení 2D a 3D chemotaxe pomalu se pohybujících buněk. Typicky se jedná o fibroblasty, rakovinné buňky, endoteliální buňky nebo keratinocyty. Rychlost jejich migrace je 1  $\mu$ m za minutu a méně. Pro účely studie byly použity HT-1080 buňky fibrosarkomu. Gradient zde byl vytvořen pomocí FBS s různou koncentrací – jeden rezervoár  $\mu$ -Slide Chemotaxis byl naplněn médiem DMEM bez FBS, druhý rezervoár obsahoval 10% FBS. Buňky fibrosarkomu byly nasazeny do pozorovací oblasti, která byla modifikována hydrogelem, přes který buňky neprojdou. Díky tomu nedocházelo k předčasné migraci nebo vyplavení buněk do okolních rezervoárů. Dále byly pro tuto studii použity lidské epidermální keratinocyty, kde byl gradient vytvořen pomocí růstových faktorů (TGF $\alpha$  a EGF). Zkoumala se také závislost jejich koncentrace na buněčné odpovědi. Právě tyto růstové faktory vyvolávaly nejsilnější řízenou migraci primárních keratinocytů. Po vytvoření gradientu se buňky pohybovaly daným směrem pouze v rozmezí hydrogelových bariér (viz Obr. 9). Buňky byly následně pozorovány fázově-kontrastní video-mikroskopií po dobu 24 hodin, přičemž snímky byly pořizovány každých 10 minut. Následně bylo manuálně označeno 35 – 45 buněk pomocí programu *NIH ImageJ Manual Tracking* a byla sledována jejich trajektorie. Vyhodnocovala se také rychlost migrace jako podíl vzdálenosti, kterou buňky urazily, a celkového času migrace. Pochopení regulačních mechanismů motility keratinocytů by mohlo vést k vývoji terapeutických metod pro hojení ran. [15]

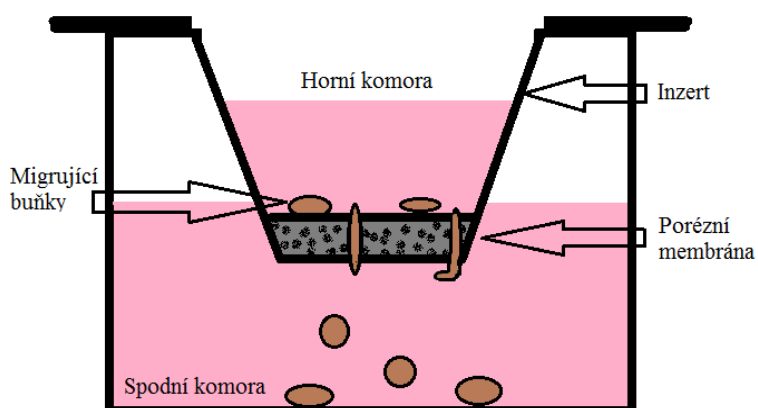


Obr. 9: A - schéma vytvoření hydrogelové bariéry a migrace buněk po směru gradientu chemoatraktantu, B - snímek keratinocytů z fázově-kontrastní video-mikroskopie v čase 0 a 20 hodin, s gradientem TGF $\alpha$  [15]

#### 2.1.4. Boydenova komůrka

Boydenova komůrka je užitečný nástroj pro studium buněčné migrace a invazivity. Skládá se ze dvou komůrek, které jsou odděleny polykarbonátovou porézní membránou s definovanou velikostí pórů, typicky 3 až 12  $\mu\text{m}$  v závislosti na velikosti buněk. Ty mají průměrnou velikost od 30 do 250  $\mu\text{m}$  a přes póry se mohou dostat aktivním pohybem. Větší spodní komůrka je naplněna živným médiem s přidaným chemoatraktantem. Menší vrchní komůrka obsahuje buňky, které mají tendenci se díky kladnému gradientu pohybovat směrem k tomuto chemoatraktantu. Přes membránu, která zde představuje určitou fyzikální bariéru, se dostanou pouze aktivním pohybem (viz Obr. 10). [5] [17]

Na principu Boydenovy komůrky jsou založeny i další migrační testy. Dále se zaměříme na *Transwell* migrační test, který je pro experimentální část této diplomové práce klíčový.



Obr. 10: Schéma Boydenovy komůrky [18]

#### 2.1.5. *Transwell* migrační testy

Jak již bylo uvedeno výše, *Transwell* test je založen na systému Boydenovy komůrky. Jedná se o komerční variantu testu, která je založena na jednorázových plastových více jamkových polích. Princip je tedy zachován – do spodní komůrky je přidáno živné médium s chemoatraktantem a do vrchní komůrky jsou nasazeny buňky, které se

pohybují přes porézní membránu. Buňky jsou obvykle obarveny fluorescenčním barvivem, takže jejich vizualizace probíhá fluorescenčním, případně konfokálním mikroskopem. Migrace tak může být sledována dlouhodobě, například pořízením snímku jednou za 10 minut po dobu 24 hodin. Lze tak získat sérii snímků pohybu buněk v čase. V závěru se vyhodnocuje podíl buněk, které prošly skrze membránu do spodní komůrky a buněk, které adherovaly ve vrchní komůrce a nemigrovaly do prostředí s vyšší koncentrací chemoatraktantu. [5]

Pro účely této diplomové práce byla použita komerční varianta testu *Corning® Transwell®-24*. Jedná se o 24jamkové pole s membránou s póry o velikosti 8  $\mu\text{m}$ . Nyní se zaměříme na několik studií, které využívají právě tuto variantu. Od nich je pak odvozen protokol, aplikovaný v experimentální části této práce.

Lze využít membránu z polyetylen-tereftalátu (PET), která efektivně blokuje přenos světla v rozsahu vlnových délek 400–690 nm, což umožňuje detekci fluorescence nedestruktivním způsobem. Před nasazením MSC do 24jamkového pole byla membrána potažena 0,1% bovinní želatinou, přes kterou následně buňky musely aktivně procházet, aby se pohybovaly směrem pozitivního gradientu. Cílem studie bylo prokázat, že i přes to, že buňky musí vyvinout určité úsilí, se aktivně snaží dostat do výhodnějšího prostředí s vyšší koncentrací chemoatraktantu. Do spodních komůrek, s 600  $\mu\text{l}$  bazálního média, byly přidány chemoatraktanty následujícím způsobem: 30 % FBS jako pozitivní kontrola, 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  růstový faktor PDGF-AB, 150  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  rekombinantní faktor SDF-Lb, 30  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  rekombinantní faktor IGF-1 a negativní kontrola 0,25 % bovinního séra. Buňky byly inkubovány přes noc a obarveny fluorescenčním barvivem *Cornig calcein AM*. Poté byly spočítány ty buňky, které se nacházely ve spodní části membrány a zpracovány softwarem *Image-Pro Plus*. Výhodou této membrány nepropouštějící světlo je, že fluorescenčně značené buňky v horní komůrce nejsou při skenování a zobrazování viditelné. Jakmile však značené buňky migrují membránou, již nejsou před světelným zdrojem chráněny a jsou snadno detekovatelné. [27] Nejlepších výsledků bylo dosaženo s růstovým faktorem PDGF-AB. Chemotaxe byla srovnatelná s pozitivní kontrolou 30% FBS. Tato metoda využívá *Corning® FluoroBlok™*, který je výhodný díky své relativní jednoduchosti. Buňky se totiž nemusí manuálně počítat, ale tímto zařízením jsou přímo čteny ze spodní strany inzertů *Transwell* pole. [25]

Systémy *Corning® FluoroBlok™* mohou mít optimalizovanou membránu, která obsahuje další materiál poskytující stejné vlastnosti ale zvýšenou efektivitu při blokování světla. Membrána je pokryta černou vrstvou, která filtruje široké spektrum vlnových délek a propouští méně než 2% v rozsahu od 400 do 690 nm. Umožňuje tak použití i modrého fluorescenčního barviva DAPI pro zvýraznění buněčných jader. Pro tuto studii byly využity HT-1080 a 3T3 buňky, které byly přidány jak do vrchní komůrky s potaženou membránou, tak do komůrky s membránou bez této optimalizace. [26]

## 2.2. Klinické studie migrace buněčné linie MSC

### 2.2.1. *Transwell* test migrace MSC z tkáně rakoviny prsu

Tato studie používá MSC získané z tkáně rakoviny prsu od 9 pacientek. Toto onemocnění je vážnou hrozbou pro ženy zejména ve vyšším věku. Přibližně u 30 % se objevují také metastázy. Navíc interakce mezi rakovinnými buňkami a jejich nejbližším prostředím je stále více považována za důležitý faktor při regulaci maligní progresu. Proto má cílená léčba rakoviny prsu velký význam, a právě MSC hrají důležitou roli při vývoji rakoviny, ať už se to týká nádorového růstu nebo vzniku metastáz. Je dobře známo, že nádorové buňky vylučují látky, jako chemokiny, cytokiny a růstové faktory, které jsou schopny aktivovat řadu MSC. Ty pak podporují jejich růst a metastazování. Účelem této studie byla izolace MSC z nádorové tkáně a následně výzkum proliferace a migrace této buněčné linie v různém prostředí. [28]

*Transwell* migrační test využíval standardně spodní komůrku pro živné medium s chemoatraktantem. Buňky byly nasazeny do horní komůrky se 100  $\mu$ l L-DMEM bez séra a byly 10 hodin inkubovány. Poté byly buňky ve vrchní komůrce opatrně odstraněny dvojím seškrábnutím pomocí vatové tyčinky a buňky, které migrovaly skrz membránu, byly zafixovány formaldehydem a obarveny. Z každé komůrky byly vybrány 4 náhodné oblasti a následně byl pro pozorování a počítání buněk při nižším zvětšení (100x) použitý *Cell Counter* software. Každý vzorek byl takto nasnímán a vyhodnocen třikrát. Mezi experimentálními vzorky a negativní kontrolou byly značné rozdíly. Buňky migrovaly daleko více po přidání chemoatraktantu BC-MS-CM (10 a 20%). [28]

*Scratch wound* test byl dalším způsobem, jak dokázat migraci těchto MSC. Po dosažení dostatečné konfluency byly buňky v jedné linii seškrábnuty. Do jednoho vzorku byl přidán chemoatraktant BC-MS-CM, do druhého nikoli. Takto byly buňky 24 hodin inkubovány. Následně bylo vyhodnoceno takzvané uzavření rány, které je pozorovatelné pod mikroskopem. Získané obrazy byly analyzovány pomocí softwaru *ImageJ*. [28]

Ukázalo se, že MSC, získané z nádorové tkáně rakoviny prsu, mají podobné vlastnosti jako MSC izolované z kostní dřeně se schopností migrace a diferenciace na osteoblasty a adipocyty. Vyšší koncentrace chemoatraktantů ve studiích *in vitro* ještě tyto schopnosti posílila. Závěrem lze říci, že se potvrdil výskyt MSC ve tkáních rakoviny prsu, a že mohou proliferovat a migrovat, a tedy významně ovlivňovat vývoj nádoru. [28]

### 2.2.2. Experimentální a klinické aplikace MSC u míšního poranění

Jednou z provedených studií je aplikace MSC v neurologii a neurochirurgii. Experimentálně byla provedena a popsána v rámci grantu Lidské zdroje pro neurovědní výzkum. Studie se snaží prokázat pozitivní výsledky po aplikaci MSC u míšních poranění. Prokázalo se několik mechanismů působení těchto transplantovaných buněk. Mezi ně patří například remyelinizace demyelinizovaných vláken, růst axonů, podpora angiogeneze a také imunosupresivní efekt – podporují imunitní reakci. MSC izolované

z kostní dřeně mohou migrovat do místa poranění díky stimulaci v dané lokalitě. To závisí na metodě aplikace MSC. Využívá se intraspinální aplikace přímo do míchy v okolí lokálního poškození, existuje však riziko sekundárního poškození. Dalšími variantami jsou lumbální punkce a intraarteriální, případně intravenózní podání, kdy jsou MSC aplikovány do cévního systému. Poté díky jejich přirozené schopnosti migrují do místa poranění. MSC reagují na růstové faktory a jsou schopny zrychlit regeneraci, ochránit neurony před apoptózou a podporují plasticitu poškozené tkáně CNS (centrální nervová soustava). Diferenciace MSC do neuronových buněk je však poměrně malá. [13]

Migraci MSC lze sledovat např. díky magnetickým nanočásticím, kterými jsou buňky označeny, a vizualizovat je pomocí magnetické rezonance. Aplikací kultivovaných MSC se výrazně zlepšila motorika a vnímání zadních končetin u hlodavců. Bylo ověřeno také zvětšení objemu bílé a šedé hmoty, histologické i funkční zlepšení. Nicméně v současné době se hodnotí zejména bezpečnost aplikace MSC, vzhledem k tomu, že ještě nejsou zcela prokázány všechny jejich účinky. Pacienti s míšním poraněním v této studii nevykazovali během experimentu ani po něm žádné větší komplikace. Dlouhodobé důsledky však zatím posoudit nemůžeme. Také musíme brát v potaz, že poranění míchy je komplexní patofyziologický proces a pro jeho potenciální léčbu bude nutné kombinovat různé terapie. [13]

### **2.2.3. Migrace MSC na místo akutního infarktu myokardu**

Kardiovaskulární onemocnění je v současné době v globálním měřítku hlavní příčinou úmrtí. I přes to, že bylo v léčbě dosaženo pokroku, stále nejsme schopni nemoci zcela předejít a zvrátit proces nemoci – nahradit poškozené kardiomyocyty novými plně funkčními buňkami. [14]

Jednou možností je transplantace MSC do poškozené tkáně, přičemž nejčastější metodou je injekce přímo do myokardu. Nicméně jde o invazivní zákrok a může vést k srdeční arytmií kvůli přímému zásahu do srdečního svalu. Alternativou je dodávka MSC přes oběhový systém. Je to méně invazivní metoda, ale hlavním problémem je ztráta buněk v oběhovém systému. Buňky jsou totiž zachytávány v plicích, játrech a dalších tkáních a jen malá část se poté dostane na požadované ischemicky poškozené místo myokardu. Migraci MSC z krevního řečiště do poškozené tkáně lze srovnat s migrací leukocytů do zánětlivých oblastí. Během zánětu se vyplavují chemické látky, které určují typ leukocytů, potřebných pro hojení. Ty následně migrují díky chemokinezi na požadované místo. Podobně při akutním infarktu myokardu vyvolá buněčná nekróza vylučování chemokinů, které působí jako navigátory pro transplantované MSC. Proto je pro studium migrace MSC velmi důležité pochopení procesů při tvorbě těchto chemokinů. I přes to, že se k poškozeným buňkám dostane jen malá část MSC, vykazuje jejich intravaskulární podání relativně dobré výsledky, snížení rozsahu infarktu a zlepšení funkce myokardu. Optimalizace této metody je zaměřena na izolaci, kultivaci a manipulaci buněk *in vitro* za účelem zlepšení jejich migrační schopnosti a cílené léčby. [14]

#### **2.2.4. Léčba intrakraniálního aneurysmatu pomocí MV MSC**

Spontánní ruptura intrakraniálních aneurysmat je významným viníkem úmrtnosti mnoha pacientů. Řešením je např. chirurgické vložení intrakraniálního stentu se zachováním průtoku hlavní tepny. Další možností je hlavní tepnu zcela zaklipovat a odříznout tak průtok krve, který může vést k ruptuře. V dnešní době existují studie a výzkumy, které se snaží přijít na léčbu aneurysmat jiným než chirurgickým způsobem. Léčba pomocí MSC se zdá být i v tomto ohledu velmi slibná. Několik studií potvrdilo, že protizánětlivý účinek MSC je při léčbě aneurysmat prospěšný. Nicméně z dlouhodobého hlediska existují rizika týkající se terapie kmenovými buňkami, proto jsou studie stále ve fázi výzkumu.

Díky svým imunomodulačním vlastnostem se podávání mikrovezikul, fragmentů vázaných na jadernou membránu uvolňovaných z lidských MSC, ukázalo jako potenciální terapie. Podařilo se dokázat, že mikrovezikuly uvolňované z MSC (dále jen MV MSC) mohou zabránit protržení intrakraniálních aneurysmat u myši potlačením aktivace žírných buněk. Při vzniku aneurysmatu totiž nese určité riziko také vznik chronického zánětu. Zvýšený počet zánětlivých buněk, včetně žírných, se může dostat do stěn nervového systému a účastnit se zánětlivé reakce, při které se uvolňuje velké množství mediátorů, jako jsou cytokiny, chemokiny nebo proteázy, které podporují vaskulární destrukci a vedou ke vzniku aneurysmatu. Imunomodulační terapie tedy může poskytnout potenciální nechirurgickou terapii, která zabrání prasknutí intrakraniálního aneurysmatu. Výhodou MV MSC je, že se podobně jako jejich mateřské buňky MSC shlukují v místech lézí, kde zprostředkovávají procesy tkáňové opravy a působí protizánětlivým účinkem. [47]

Pro tuto studii byly MSC kultivovány v živném mediu ve vhodných podmínkách a při pasážích 3 – 10 byly použity pro experimenty a pro izolaci mikrovezikul. Ty byly získány ze supernatantů MSC zbavených séra použitím ultracentrifugace při 100 000 otáčkách po dobu 1 hodiny při 4°C. Izolované mikrovezikuly byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku. Bylo zjištěno, že k ruptuře aneurysmatu dochází 6. až 7. den po jeho indikci. Podávání MV MSC bylo tedy zahájeno 6. den, což umožnilo sledovat účinky rychlosti ruptury v závislosti na podání mikrovezikul. Myším s aneurysmatem bylo podáno 30 µl MV MSC ve fyziologickém roztoku intravenózně 6. a 9. den po indikaci aneurysmatu. Výsledkem byla výrazná redukce prasknutí intrakraniálního aneurysmatu u myši, což bylo spojeno se sníženou aktivací žírných buněk kolem aneurysmatických tepen. [47]



### 3. CHEMOATRAKTANTY

Chemoatraktant je malá rozpustná molekula, které indukuje pohyb buněk ve směru jeho nejvyšší koncentrace. Jsou to proteiny nebo peptidy produkované například bakteriemi, zánětlivými či nezánětlivými buňkami, které se uvolňují z poškozené tkáně. Vytvářejí vazbu s receptory na leukocytech, což způsobuje stimulaci nebo aktivaci dalších látek. Jak již bylo popsáno výše, na základě různé koncentrace chemoatraktantu vzniká gradient, který udává směr pohybu buněk. [21]

Největší skupinou chemoatraktantů jsou chemokiny. Patří do skupiny cytokinů o velikosti 8 – 10 kDa (1 Da = jedna dvanáctina atomové hmotnosti uhlíku, která odpovídá  $1,66 \cdot 10^{-27}$  kg [20]). Mají chemotaktický účinek na leukocyty, působí nádorový růst, přispívají k angiogenezi a mají také imunologický účinek. Chemokiny se dále dělí podle chemické struktury na čtyři skupiny – C (Lymfotaktin), CC (RANTES), CXC (Interleukin-8) a CX<sub>3</sub>C. Každý chemokin specificky reaguje na určitý typ receptoru. Nicméně většina chemokinových receptorů rozpoznává více než jeden chemokin a několik chemokinů se může vázat na více než jeden receptor. Existuje však specifita receptor-ligand, podle které se např. CXC chemokiny vážou výhradně na CXC receptory, podobně jako se CC chemokiny vážou pouze na CC receptory. [21] [22]

#### 3.1. Růstový faktor odvozený z krevních destiček

Pro účely této diplomové práce byl jako chemoatraktant zvolený rekombinantní růstový faktor odvozený z trombocytů (PDGF, z angl. *Platelet-Derived Growth Factor*). Vyskytuje se ve třech verzích – PDGF-AA, PDGF-AB a PDGF-BB. PDGF je peptidový růstový hormon uvolňovaný při přilnutí trombocytů k traumatizované tkáni. Buňky pojivové tkáně v blízkosti postižené oblasti reagují a zahájí proces replikace, přičemž syntéza PDGF je indukována díky působení mnoha látek, které se při poranění vyplavují, jako např. IL-8, IL-6 a další. [24] PDGF je homodimer exprimovaný v *E. coli* a samotný je vyroben ve formě lyofilizovaného prášku, který vzniká sušením při nízkých teplotách. Tento růstový faktor byl použitý v několika biomedicínských a biologických studiích – pro výzkum kultury proximálních tubulů a glomerulárních explantátů, pro výzkum vlivu různých sloučenin a inhibitorů na signální dráhy růstového faktoru nebo ve studii migrace prováděných na základě *Transwell* testů. PDGF-BB jako takový by mohl být potenciálně použitý pro modifikaci funkce MSC, aby se zvýšila jejich terapeutická účinnost při různých klinických aplikacích. [23] [48]

PDGF má v lidském organismu více funkcí a reaguje s řadou buněk. Působí mitogenně pro buňky odvozené z mezodermu, jako jsou fibroblasty, buňky hladké svaloviny cév, gliové buňky a chondrocyty. Významně aktivuje chemotaxi neutrofilů, monocytů a fibroblastů. Zvyšuje syntézu fosfolipidů, esterů cholesterolu, glykogenu a prostaglandinů a moduluje vazbu LDL (lipoprotein s nízkou hustotou) na receptor. Dále stimuluje proliferaci fibroblastů a usnadňuje reparaci tkáně díky tomu, že napomáhá produkci extracelulární matrix. Také je důležitým regulátorem kostní homeostázy,

reparace a regenerace tkáně. Dále se zjistilo, že PDGF-BB hraje významnou roli v angiogenezi a je exprimován při nádorovém růstu. [23]

### **3.1.1. Studie s použitím PDGF**

V této podkapitole je popsána studie, která demonstruje regulaci exprese MSC pomocí PDGF-BB prostřednictvím signálních drah a působí jako silný spouštěč invazních a proliferačních aktivit MSC. Pro tyto účely byly použity MSC z kostní dřeně krys. Buňky byly kultivovány v živném mediu s penicilinem a streptomycinem. Poté byly vystaveny stimulaci PDGF-BB po dobu 12 hodin s koncentrací  $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro vyhodnocení bylo provedeno realtime PCR pro reverzní transkripci, aby bylo možné identifikovat velikost produktů. Pro 3D invazní test byly MSC vloženy do  $100 \text{ }\mu\text{l}$  kolagenu s koncentrací  $2,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  do 96jamkového pole. Poté byly buňky v kolagenu přeneseny na kultivační destičku s  $500 \text{ }\mu\text{l}$  kolagenu. Do těchto kultur bylo přidáno PDGF-BB s koncentrací  $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a takto byly MSC kultivovány po dobu 3 dnů. Následně pomocí fázové mikroskopie bylo hodnoceno, jak buňky migrovaly z kolagenu, ve kterém byly nasazeny, do vnějšího kolagenu. Počet migrovaných buněk byl spočítán v pěti náhodně vybraných polích. [48]

Výhodou kolagenových hydrogelů je to, že připomínají fyziologické podmínky pro buňky, protože mají podobnou strukturu jako intersticiální matrix ve většině tkání *in vivo*. Proto byly krysí MSC kultivovány v těchto 3D kolagenových gelech a invazní aktivita buněk byla monitorována buď v přítomnosti nebo nepřítomnosti PDGF-BB. Během této tří denní kultivace byl počet invazních buněk v přítomnosti PDGF-BB dvojnásobný ve srovnání s invazí buněk, které PDGF-BB nebyly vystaveny. Podobných výsledků bylo také dosaženo, pokud MSC byly nasazeny do inzertů 24jamkového pole s přidaným PDGF-BB ve spodní jamce destičky. Tímto způsobem byla také vyhodnocena směr invaze a účinek PDGF-BB na MCS. Také, jak bylo předpokládáno, s PDGF-BB se zvýšila exprese některých specifických proteinů. [48]

## **3.2. Fetální bovinní sérum (FBS)**

FBS je tekutá frakce vysrážené krve z plodu krav, zbavená buněk, fibrinu a koagulačních faktorů, ale obsahující velké množství nutričních a makromolekulárních faktorů nezbytných pro růst buněk včetně růstových faktorů. Hlavní složkou FBS je bovinní sérový albumin, ale obsahuje také řadu malých molekul, jako jsou aminokyseliny, cukry, lipidy a hormony. [44] FBS se často využívá v široké škále aplikací buněčných kultur, zejména pak pro udržení vitality a proliferaci buněk. Nicméně pro lidské buňky není zcela fyziologickým prostředím, proto může při výzkumech docházet ke zkresleným nebo nepřesným výsledkům. FBS dále nachází uplatnění při výzkumu, výrobě a kontrole vakcín a léčiv a používá se k zástavě trávení trypsinem nebo k ochraně při kryokonzervaci. Některé z růstových faktorů, obsažených v FBS, také podporují proliferaci kmenových buněk. FBS je dnes hojně využíváno ve výzkumech a v literatuře lze najít různé způsoby aplikace. [44]

## 4. KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Optické zobrazovací přístroje mohou zvětšit drobné objekty, přiblížit vzdálené objekty na obloze a odhalit detaily, které jsou pouhým okem neviditelné. Nicméně za cenu omezené hloubky ostrosti. Naše oko, které lze přirovnat k optickému zobrazovacímu systému, má stejný problém, ale náš mozek je natolik inteligentní, že než se získaný signál dostane do vědomí, odstraní všechny informace, které oko nevidí zaostřeně. Ovšem to nefunguje, pokud je jakákoli scéna snímána na fotografii. Optimalizací parametrů sice můžeme zvýšit hloubku ostrosti, ale obvykle tím ztratíme rozlišení a také informace o poloze Z. Ovšem pokud by bylo možné zaznamenávat pouze zaostřenou rovinu či objekty a zaměřit se na konkrétní Z-osu, vyřešilo by to problém hloubky zaostření. Řešením je tedy zaznamenání většího množství obrázků s různou hloubkou ostrosti a následná rekonstrukce, čímž lze získat ostrý snímek bez rozmazaných částí. [34]

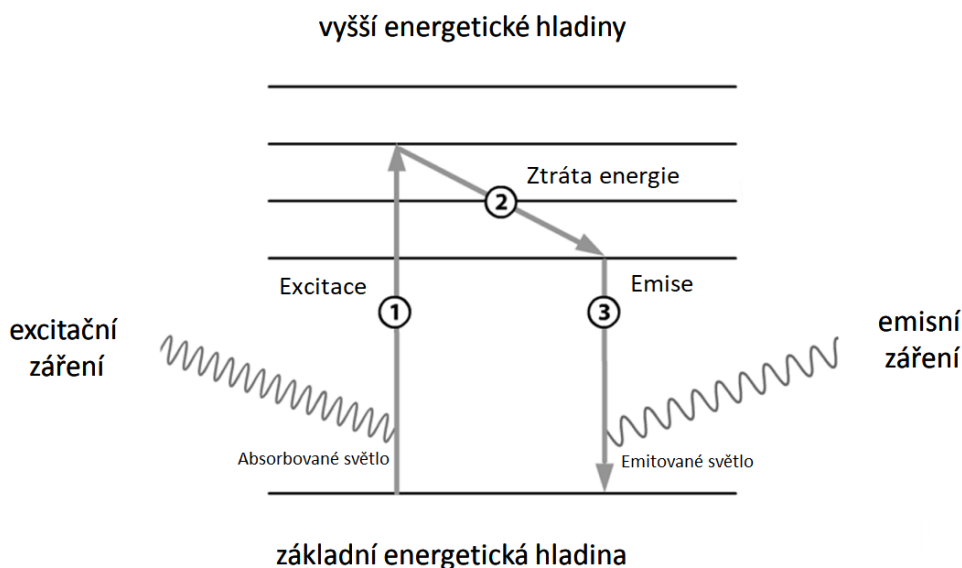
Takového principu využívá konfokální laserová skenovací (rastrovací) mikroskopie (CLSM, z angl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*). První konfokální mikroskop byl sestaven v roce 1955 Marvinem Lee Minským, vědcem, který se zabýval umělou inteligencí a studiem nervových sítí v mozku. Snažil se zaznamenávat děje v živých tkáních pomocí fluorescenčního mikroskopu, ale podařilo se mu získat pouze neostrý obraz tkáně mozku z důvodu zachycení fluorescence struktur mimo rovinu ostrosti. Základem jeho nového mikroskopu byly dvě bodové clonky, které eliminovaly světlo, které pocházelo právě z těchto struktur, a které zvyšovaly signál proti pozadí. Dnešní mikroskopy fungují na principu skenování, tedy posunu ohniska excitujícího laserového paprsku. Schéma tohoto mikroskopu vidíme na obrázku níže (viz Obr. 12). V této kapitole se nejprve zaměříme na fyzikální princip fluorescence a mikroskopu, který je na ní založený, a následně bude popsána funkce laserového skenovacího konfokálního mikroskopu, jeho jednotlivé části a princip, jakým získáváme obraz. [38]

### 4.1. Fluorescence

Pokud určité molekule, zpravidla elektronu, dodáváme energii ve formě světla, může vyzařovat světlo jiné barvy, resp. jiné vlnové délky. Po absorpci jiného elektromagnetického záření (excitace) dochází k záření sekundárnímu (emise). Pokud je doba emise po odstranění zdroje excitačního záření v řádech  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekundy, je tento jev známý jako fluorescence. Pokud i po odstranění zdroje excitace dochází k emisi po dobu několik sekund až hodin, jedná se o fosforescenci, tou se však nebudeme zabývat, protože z našeho hlediska pro mikroskopii nemá význam. [40]

Pokud molekula absorbuje foton vysoce energetického světla, způsobí tím zvýšení jejího energetického stavu a molekula se dostane do vyšší energetické hladiny. Tento excitovaný stav je však nestabilní, proto se molekula vrací zpět do základní stabilní hladiny a při tomto přechodu emituje světlo s nižší energií, tedy s kratší vlnovou délkou. Barva vyzařovaného světla a jeho vlnová délka závisí na materiálu, přičemž

excitační záření je nejčastěji v oblasti viditelného světla, UV záření nebo RTG paprsků. Fluorescenční spektrum je charakteristické pro každou látku a je posunuto vzhledem k excitačnímu záření k vyšším vlnovým délkám na základě Stokesova zákona. Absorpční a emisní spektrum pak tvoří zrcadlové obrazy. Princip fluorescence je znázorněn na obrázku níže (viz Obr. 11). [40] [42]



Obr. 11: Princip fluorescence; převzato z [40] a upraveno

#### 4.1.1. Fluorescenční barviva

Ne všechny materiály vykazují schopnost fluorescence. Obvykle platí, že organické látky, které mají tuto schopnost, mají ve své struktuře systém konjugovaných dvojných vazeb, nejčastěji pak propojená benzenová jádra. Pro studium buněčných procesů a struktur se používají fluorescenčně značené peptidy, enzymy a další látky důležité pro správnou funkčnost buňky. Příkladem je např. fluorescein – fluorescenční barvivo, které je založeno na tomto principu a po excitaci modrým světlem emituje zelené světlo, které má menší energii a větší vlnovou délku než světlo zelené. Výhodou fluorescence pro mikroskopii je to, že molekuly fluorescenčního barviva lze často vázat s konkrétní částí vzorku, takže pouze tyto části jsou poté viditelné ve fluorescenčním mikroskopu. Tyto barviva lze kombinovat a použít různé barvivo na různé části vzorku. Ve výsledku získáme obraz z několika kanálů (tolik kanálů, kolik je použitých barviv), které spojením vytvoří jeden obraz se všemi částmi. Emisi různé fluorescence lze docílit změnou excitačního světla. Nejdříve se použije jedno excitační světlo, které vyvolá emisi konkrétní fluorescence. Poté se excitační světlo změní tak, aby docházelo k emisi jiného fluorescenčního světla. Tak rozlišíme jednotlivé části vzorku. [40]

Pro účely této diplomové práce bylo použito barvivo *CellTracker™ Green* (CMFDA). Je to sloučenina 5-chlormethylfluorescein dicetát, fluorescenční barvivo vhodné pro trasování a monitorování pohybu buněk. Jeho excitační spektrum je 492 nm, tedy modré světlo a jeho emisní záření má vlnovou délku 517 nm, takže vyzařuje zelené světlo. CMFDA volně prochází buněčnou membránou do buněk, kde je rovnoměrně

rozmístěno v cytoplazmě. Při dělení buňky se barvivo rovnoměrně rozdělí do dceřiných buněk. Při dobrých podmínkách je pak možné sledovat buněčné procesy až po dobu 72 hodin. [16]

Dalším barvivem, které se využívá v buněčné biologii je modré fluorescenční barvivo DAPI, 6-diamidino-2-fenylindol. DAPI se využívá jako kontrastní barvivo buněčných jader ve fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii a také pro chromozomové barvení. Váže se na DNA v buněčném jádře v oblastech AT. Toto barvivo je za normálních okolností pro buněčnou membránu nepropustné. Proto je nejprve nutné narušit membránu působením štěpícího enzymu. Maximální excitace pro DAPI je na vlnové délce 358 nm, takže se zde využívá excitace UV světlem. Emisní spektrum je na 461 nm, což odpovídá modré barvě. [41]

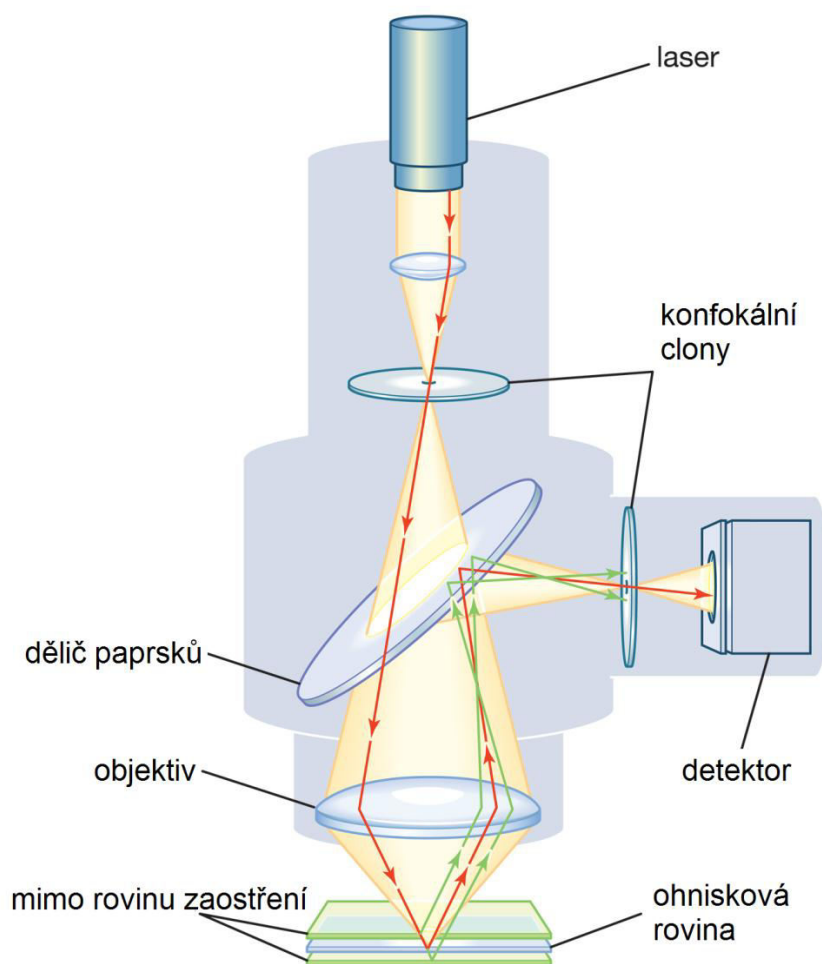
#### **4.2. Princip laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu**

Fluorescenční mikroskop funguje na principu excitace velké plochy vzorku a detektor poté přijímá i fluorescenci mimo rovinu ostrosti. Bodová clona, přidaná před detektor, však může blokovat průnik tohoto světla. Rozlišení v ose Z, tedy tloušťka optického řezu, závisí na vlnové délce použitého laseru, numerické apertuře objektivu (NA), indexu lomu komponent v optické dráze a průměru bodové clonky, přičemž průměr clonky je ve většině případů nastavitelný. Malý průměr bodové clonky vytváří velmi tenké a ostré řezy, nicméně za cenu minimálního procházejícího světla. Naopak velký průměr clonky má za následek vyšší intenzitu signálu, ten ale může obsahovat i informace z oblastí mimo rovinu ostrosti. [38]

Podstatou konfokální mikroskopie je zaostření světelného zdroje na bod a detekce obrazu skrz aperturu. Obraz tedy není tvořen vcelku, ale bod po bodu, tzv. skenováním z velmi omezených oblastí zájmu. Na ose Z jsou snímány body skenováním v rovině XY, následně je přesně definovaným posuvem skenována další rovina Z. Tímto principem získáváme jednotlivé dvourozměrné řezy, které je možné pomocí vhodného softwaru rekonstruovat. Konfokální obrazy jsou tedy 2D řezy vzorkem v různých ohniskových vzdálenostech, danými osou Z. Dnešní softwary už navíc umožňují zvolit několik bodů ve snímku a pro každý upravit ohnisko tak, aby byl obraz co nejostřejší. Okolní body jsou poté optimalizací upraveny. [36] [38]

Nejprve tedy dochází k fokusaci laserového paprsku na clonku. Nezměněný paprsek prochází objektivem až na vzorek, kde je fokusován do bodu. Světlo, které nyní nese informaci o konkrétním bodu na vzorku je odraženo zpět do objektivu. Nemusí se již jednat o původní paprsek. Ten se mohl na vzorku také rozptýlit nebo vyvolat fluorescenční záření. Toto sekundární světlo putuje pomocí děliče paprsků opět přes bodovou clonku, která filtruje světlo pocházející z oblastí mimo rovinu zaostření. Toto světlo by u běžného mikroskopu zhoršovalo kvalitu obrazu, protože snižuje kontrast. Clonka je umístěna před fotonásobič, který detekuje a násobí světelnou informaci. Obraz jedné zaostřené roviny pak lze získat skenováním (rastrováním) bod po bodu buď rozmítáním samotného laserového paprsku, posunem vzorku před objektivem nebo

posunem objektivu nad vzorkem. Rozmítání paprsku je umožněno jeho posunem pomocí natáčecích zrcadel, která jsou umístěna mezi dichroickým zrcadlem a objektivem. [36] [38] Schéma konfokálního skenovacího mikroskopu je znázorněno na obrázku níže (viz Obr. 12).



**Obr. 12: Schéma konfokální mikroskopie, převzato z [35] a upraveno**

#### **4.2.1. Detekce signálu**

Jak již bylo popsáno výše, většina vzorků, používaných v konfokální mikroskopii, se vyznačuje fluorescencí. Některé druhy vzorků fluoreskují spontánně, ale většina je obarvena barvivou, která fluoreskuje po excitaci laserovým světlem. [35] Tato fluorescence je snímána detektory. Pro detekci signálu u laserové konfokální mikroskopie se používá fotonásobič. Jedná se o citlivý detektor světla v širokém rozsahu vlnových délek (UV, viditelné světlo, část IR). Jeho cílem je zesílení elektromagnetického záření, které nese informaci o vzorku (fluorescence z preparátu) a převod na měřitelný elektrický proud. Skládá se z fotokatody, urychlující elektrody, systému dynod a anody. Zjednodušeně lze jeho princip popsat jako převod fotonu na elektron pomocí fotokatody, následovaný znásobením elektronů v poli dynod a konečně detekce, která probíhá na citlivé anodě. Elektrony jsou urychlovány připojeným vysokým napětím na katodu a dynody, které je rozděleno pomocí děliče napětí. Konečné znásobení přes pole

dynod je až milionkrát, to znamená, že jeden dopadající foton vyvolá emisi až  $10^6$  elektronů. [38] [43]

Dalším způsobem detekce signálu je pomocí dnes široce využívaných CCD kamer. Princip je podobný jako fotonásobič. CCD (z angl. *Charge-coupled device*, „nabité vázané prvky“) také přeměňuje dopadající foton na měřitelný elektrický proud s tím rozdílem, že k fotoelektrickému jevu zde dochází díky polovodičovým součástkám. CCD čip se skládá z většího množství elektrod, jejichž velikost definuje velikost pixelu. Nad sítí elektrod je umístěný polovodičový křemíkový světločivý plátek a pro elektrony nepropustná vrstva oxidu křemičitého. Na tyto atomy křemíku dopadá foton. Poté opět na základě fotoefektu dochází k uvolnění elektronů z polovodičového materiálu, které zachycují kladně nabitě elektrody. Signál se poté „přelévá“ z jednoho pixelu na druhý a elektrony, které se dostanou na okraj pole, jsou snímány a zesilovány. Obraz potom závisí na množství světla, které dopadlo na konkrétní místo kamery. Tedy čím více světla, tím jasnější pixel vznikne. [43]

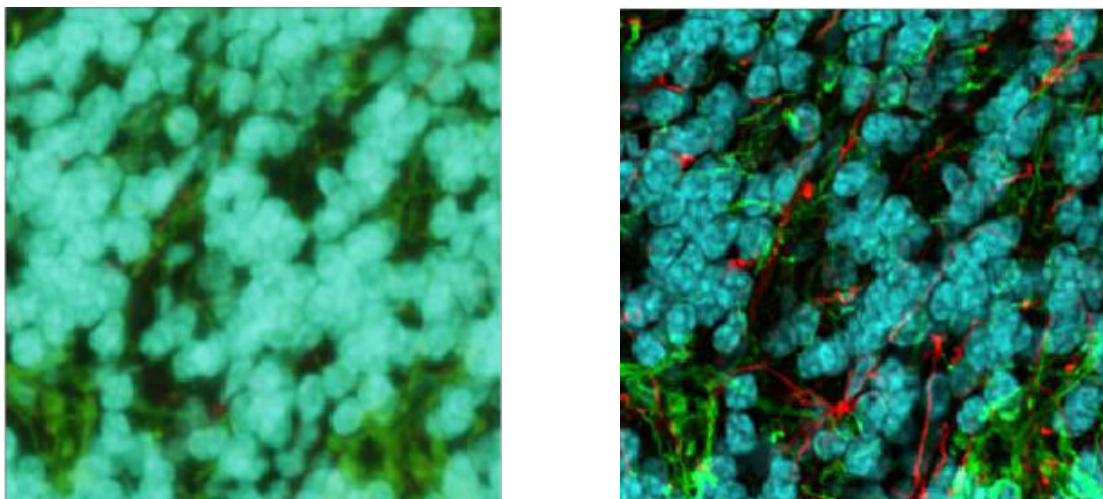
V moderní mikroskopii je obraz následně tvořen v počítači, kde získáváme informaci o intenzitě signálu a poloze bodu. Obrazy jsou tvořeny jednotlivými rovinami preparátu a seskládáním, resp. rekonstrukcí těchto rovin. Software umožňuje 3D, případně 4D projekci. [38]

### **4.3. Výhody a nevýhody konfokální mikroskopie**

Velkou výhodou konfokální mikroskopie je možnost řízení hloubky ostrosti, pořizování snímků pouze v této rovině a filtrace rozostřených rovin. Z toho vyplývá další výhoda – z mnoha takto získaných zaostřených rovin lze rekonstrukcí získat 3D obraz s velkou hloubkou ostrosti. To je v dnešní době poměrně významná přednost, protože 3D technologie je současně velmi žádaná a neustále se vyvíjí. V buněčné biologii je také velmi žádané sledování buněčných procesů, jako je migrace a vývoj buněk. To konfokální mikroskopie umožňuje pomocí dlouhodobých skenů. Vzorek je vložen pod mikroskop a po nastavení roviny ostrosti lze spustit snímání v předem definovaných časových intervalech po dobu např. 24 nebo 48 hodin. Takto získaná série obrázků se následně zpracovává za účelem sledování vzorku v průběhu času. Navíc tato technika nevyžaduje fixaci buněk, ale umožňuje použití menšího inkubátoru přímo na mikroskopu, takže buňky a tkáně mohou být sledovány v relativně přirozeném prostředí. [35] [36]

Další výhodou je rychlost skenování, která je až 0,488 ms na jeden snímek. Rychlost snímání vždy ovlivňuje výsledné rozlišení, nicméně s vyvíjejícími se mikroskopy dnes máme poměrně krátkou dobu akvizice na jeden snímek s dostatečně velkým rozlišením. [35] [36] Další vlastností je na rozdíl od jiných optických mikroskopů schopnost shromažďovat sériové snímky z poměrně tlustých vzorků. To, co by v běžné světelné mikroskopii nebylo možné pozorovat kvůli tomu, že světlo neprojde velkou vrstvou materiálu, konfokální mikroskop naskenuje po jednotlivých rovinách a obraz opět rekonstruuje. S použitím optických řezů lze také vidět preparát „z boku“ a zobrazit

např. vnitřní strukturu vzorku. V laserové skenovací mikroskopii je možné zobrazovat vzorky o tloušťce až 100  $\mu\text{m}$  s tloušťkou řezu i menší než 500 nm. [39]



**Obr. 13: Srovnání rozlišení standardní (vlevo) a konfokální mikroskopie (vpravo); na obrázku je neuronová síť myší mozkové tkáně [39]**

Nevýhodou skenovací konfokální mikroskopie je omezení optického rozlišení, nebo také difrakční limit. Je to vzdálenost dvou bodů, které jsou ještě rozlišitelné jako dva samostatné body a nejsou splynuty v jeden bod. Toto rozlišení ovlivňuje přirozená difrakce světla, tedy ohyb světla na šterbině, který vzniká průchodem paprsku optikou mikroskopu. Dále ho ovlivňuje numerická apertura, vady čoček a vlnová délka. Nicméně na základě znalostí vlastností difrakčního obrazce lze moderním softwarem při použití dekonvoluce tento nechtěný signál odstranit. Další nevýhodou je postupné „vysvícení“ fluorescenčního barviva ve vzorku, takže po opakovaném skenování se objekty mohou jevit jako méně viditelné. [38]

#### **4.4. Multi-fotonová fluorescenční mikroskopie**

Multi-fotonová fluorescenční mikroskopie je metoda velmi podobná konfokální mikroskopii. Umožňuje pozorování vzorků s velkou optickou hloubkou, opět je založena na snímání jednotlivých řezů tkání. Využívá infračervený pulsní laser, tedy excitaci fotony s nižší energií a větší vlnovou délkou. Právě díky nižší energii dochází k mnohem menšímu poškození vzorku. Navíc biologické preparáty lépe absorbují záření o větší vlnové délce, fotony tedy pronikají hlouběji. [38]

Jednou variantou je dvoufotonová fluorescenční mikroskopie, kdy dochází současně k absorpci dvou fotonů a k excitaci fluorochromu (fluorescenčního barviva). Výhodou je, že dva excitační fotony mají přibližně dvakrát větší vlnovou délku a zároveň poloviční energii ve srovnání s excitací, kterou je schopen vyvolat jednotlivý foton. K excitaci fluoroforu dochází zejména v místě zaostření paprsku laseru a to díky tomu, že absorpce dvou fotonů v místě zaostření je mnohem pravděpodobnější než v ostatních nezaostřených rovinách. Excitace je tedy soustředěna do velmi malého bodu, takže není nutná bodová clona jako u skenovací konfokální mikroskopie. Nicméně je zde relativně nízká pravděpodobnost absorpce dvou fotonů, protože fotony vyvolají



excitaci, pouze pokud dopadnou po sobě v intervalu asi  $10^{-18}$  sekundy. Tato technologie tedy vyžaduje vysoce účinný pulsní infračervený laser. Pro detekci se zde opět používá fotonásobič pro zesílení signálu. Jeden snímaný bod pak odpovídá jednomu pixelu, případně voxelu. [38]

V dnešní době existuje také třífotonová mikroskopie, která využívá současné absorpce tří fotonů.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5. PRÁCE S BUNĚČNOU LINIÍ

Experimentální část a práce v laboratoři je hlavním bodem této práce. Buněčná linie MSC již byla popsána v samostatné kapitole výše (viz Mesenchymální kmenové buňky). Proto se touto teorií nebudeme dále zabývat. Připomeneme si pouze, že se jedná o mesenchymální kmenové buňky získané z tukové tkáně. Dále se zaměříme na popis kultivace této buněčné linie a na její pasážování.

### 5.1. Potřebné vybavení a použitý materiál

- buněčná linie MSC izolovaná z adipocytů
- kultivační lahve/více-jamková pole
- medium pro MSC - DMEM/bezsérové medium
- *μ-Slide Chemotaxis*
- *Transwell* destička s inzerty
- PBS
- FBS
- PDGF-BB
- akutáza
- Triton X
- paraformaldehyd
- fluorescenční barvivo *CellTracker™ Green CMFDA*
- fluorescenční barvivo DAPI
- Bürkerova komůrka
- Petriho misky
- konfokální misky
- sterilní ubrousky
- vatové tyčinky
- pipety
- pinzeta
- dH<sub>2</sub>O
- centrifuga
- Konfokální mikroskop Leica TCS SP 8X
- Buněčný inkubátor
- alobal

## 5.2. Kultivace a pasážování buněčné linie MSC

Buňky jsou kultivovány v kultivačních lahvích, případně ve 24jamkových polích vyrobených z plastového materiálu, na který buňky adherují. Vyživovány jsou kultivačním médiem pro MSC obsahující potřebné látky nejen pro přežití buněk, ale také přispívající k vytvoření vhodných podmínek pro jejich následné rozmnožování. Medium se svým složením podobá extracelulární tekutině – obsahuje anorganické soli, aminokyseliny, mastné kyseliny a lipidy, vitamíny, glutamin, proteiny a peptidy podporující buněčné dělení a sérum, které udržuje stálé pH. Pro lepší identifikaci obsahuje také fenolový červený indikátor.

MSC jsou po nasazení do kultivační lahve/jamky rovnoměrně rozprostřeny v mediu. Kultivujeme je v buněčném inkubátoru, který zajišťuje co nejpřirozenější fyziologické podmínky. Uvnitř je teplota 37°C a vysoká relativní vlhkost se stálou atmosférou CO<sub>2</sub> s procentuální hodnotou kolem 5%. [9] Pokud mají MSC zajištěny všechny tyto podmínky, začnou postupně adherovat ke dnu lahve nebo jamky a dělit se. Po vyčerpání živin z media buňky ztrácí schopnost se dělit a nemají dostatek potřebných látek pro přežití. Proto je nutné pravidelně medium měnit.

Postupně buňky pokryjí téměř celé dno kultivační nádoby a nemají prostor k dalšímu dělení. Proto je nutná jejich pasáž. MSC se od kultivačního dna uvolní působením enzymu akutázy. Roztok i s buňkami je přenesen do centrifugační zkumavky nebo eppendorfky a centrifugací jsou buňky od supernatantu odděleny. Takto koncentrované buňky se resuspendují s novým médiem a část buněk se nasadí do nové kultivační lahve nebo jamky. Ostatní buňky lze využít na experiment.

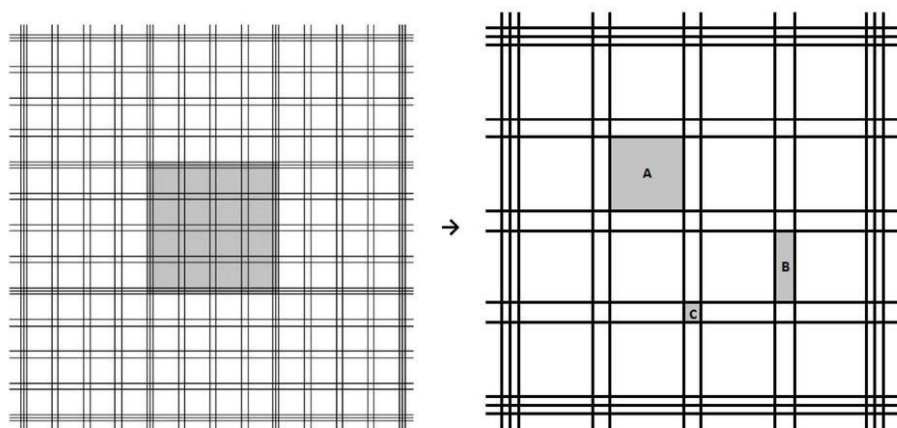
Pasáž je nutné opakovat kvůli zachování buněčné linie a kvůli získání buněk k experimentům. Nicméně MSC se dělí relativně pomalu, a proto tento proces trvá řádově dny až týdny.

## 5.3. Koncentrace buněk

Abychom postupovali podle protokolu *μ-Slide Chemotaxis*, je nutné znát přibližné množství buněk nasazených při experimentu. Protokol totiž doporučuje pracovat s relativně velkou buněčnou koncentrací, a to 3·10<sup>6</sup> buněk·ml<sup>-1</sup>. Pro výpočet byla použita Bürkerova komůrka a barvivo. Komůrka je tvořena 9 velkými čtverci o obsahu 1 mm<sup>2</sup> a ten je dále rozdělen do 16 menších čtverců. Pro počítání je stanoveno pravidlo, kdy se vybere jeden velký čtverec, v něm se zvolí počítací oblast (A, B nebo C, nejčastěji se volí oblast čtverce A) a započítávají se pouze ty buňky, které jsou obsaženy uvnitř čtverce a ty, které se dotýkají dvou stanovených stran. Koncentrace se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$X = \frac{a \cdot 1000 \cdot z}{n \cdot V} \quad 1$$

kde  $X$  je výsledná koncentrace buněk,  $a$  je stanovený počet buněk,  $z$  je použité zředění,  $n$  je počet počítaných čtverců a  $V$  je objem počítaného útvaru.



Obr. 14: Mřížka Bürkerovy komůrky [51]

Pro účely tohoto experimentu bylo použito ředění 2, které jsme získali tak, že k 30  $\mu\text{l}$  buňkám bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  barviva. Suspenze byla rozmíchána a na mřížku Bürkerovy komůrky byla přidána jedna kapka této suspenze tak, aby pokryla celou mřížku. Poté na ní bylo opatrně položeno tenké sklíčko tak, aby ve štěrbinách zůstal určitý objem suspenze s obarvenými buňkami.

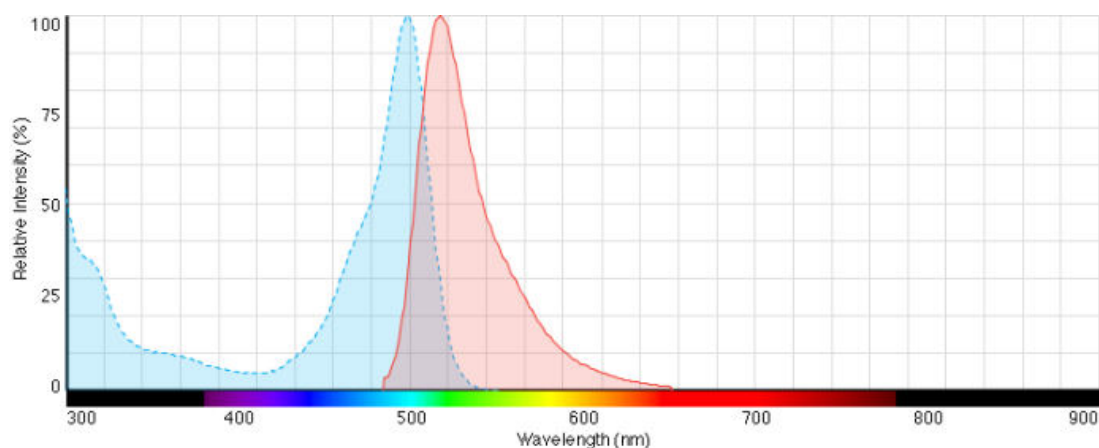
#### 5.3.1. Příklad výpočtu

V prvním experimentu byla koncentrace počítána ze čtverců A s obsahem 0,04  $\text{mm}^2$  a objemem 0,004  $\text{mm}^3$ . Počet buněk byl stanoven na 16 a bylo použito zředění 2. Po dosazení do vzorce [1] je výsledná koncentrace 500 000 buněk· $\text{ml}^{-1}$ .

$$X = \frac{16 \cdot 1000 \cdot 2}{16 \cdot 0,004} = 500\,000 \text{ buněk} \cdot \text{ml}^{-1}$$

### 5.4. Barvení buněk

Pro sledování buněk při migraci a pro následné vyhodnocení je potřeba pořizování snímků pomocí konfokální mikroskopie, která pracuje na principu detekce fluorescenčního záření. K vizualizaci buněk se využívá fluorescenční barvivo CMFDA green (5-chlormethylfluorescein diacetát). Výhodou je dlouhé zachování barviva a to po dobu až 72 hodin. Vyznačuje se nízkou cytotoxicitou, jeho použití tedy nemá téměř žádný efekt na viabilitu nebo proliferaci buněk. Excitační spektrum CMFDA green je na vlnové délce 492 nm a emisní spektrum na vlnové délce 517 nm. Buňky jsou tedy na snímcích obarveny zeleně. Barvivo bylo navrženo tak, aby volně procházelo buněčnou membránou do buňky, kde se přemění na reakční produkty, které již buněčnou membránou neprostoupí. Díky tomu je zachováno i po vícenásobném dělení buněk. [16]

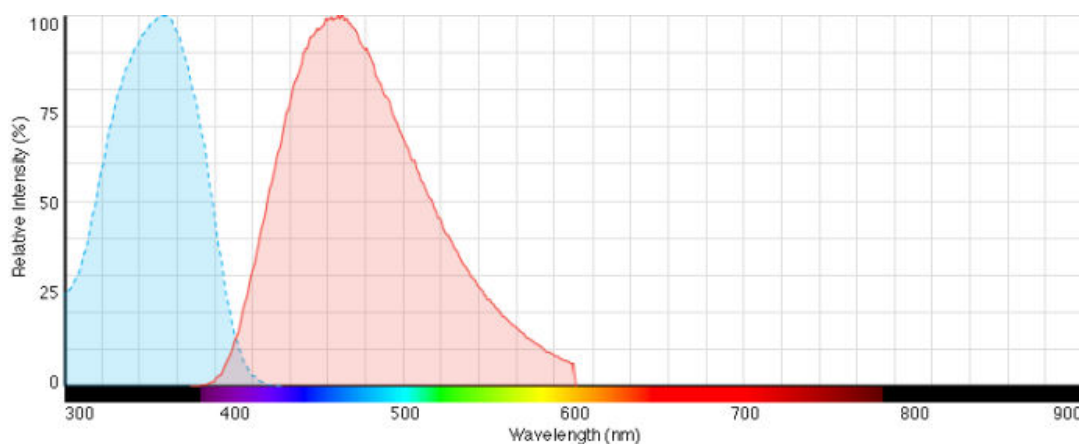


**Obr. 15: Excitační a emisní spektrum barviva CMFDA green [16]**

Barvení buněk v těchto experimentech probíhalo před pasáží. Byla použita finální koncentrace barviva  $1 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  přidáním  $0,1 \mu\text{l}$  barviva do  $100 \mu\text{l}$  bezsérového media. Buňky byly promyty PBS a po přidání barviva byly inkubovány po dobu 15 minut. Poté bylo barvivo odsáto a znovu byl povrch promyt PBS. Následovala pasáž s již obarvenými buňkami.

Pro optimalizaci bylo v posledních dvou experimentech použito barvivo DAPI, které slouží k vizualizaci jader pod fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopem. Barvivo se k buněčné suspenzi přidává buď před fixací nebo až po ní. V případě MSC se více osvědčilo barvení jader po fixaci. Když byly obarveny ještě před ní, docházelo častěji k rozptýření barviva i v cytoplazmě. Po fixaci paraformaldehydem je nutné nejdříve naleptat membránu naředěným tritonem, poté rychle propláchnout PBS a přidat na 30 minut DAPI. Po naleptání membrány se barvivo lépe dostane do jádra a není tolik v cytoplazmě. Díky tomu lze jednodušeji vyhodnocovat počet jader, protože jsou viditelná jako kulovité útvary v obraze. [41]

Excitační spektrum DAPI je na vlnové délce 340 nm, což odpovídá UV záření. Jeho emisní spektrum odpovídá modré barvě s vlnovou délkou 488 nm. Obě spektra jsou zobrazeny na obrázku níže (viz Obr. 16). [41]



**Obr. 16: Excitační a emisní spektrum barviva DAPI [41]**

## 6. BUNĚČNÁ MIGRACE

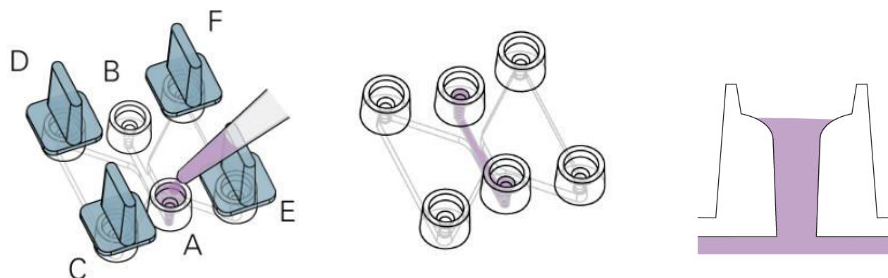
### 6.1. *μ-Slide Chemotaxis*

#### 6.1.1. Protokol pro nasazení buněk

Pro 2D experiment musí být buňky adherentní a musí přilnout k povrchu pozorované oblasti. Den před nasazením buněk a provedením experimentu je nutné umístit buněčnou kulturu a ostatní potřebné vybavení pro experiment do buněčného inkubátoru zejména kvůli ekvilibraci plynů. Metodika experimentu podle protokolu *2D and 3D Chemotaxis Assays Using μ-Slide Chemotaxis: Application Note 17* ([10]) je popsána níže.

- I. Rozbalte *μ-Slide Chemotaxis* a vložte jej do Petriho misky o průměru 10 cm se sterilním vlhkým ubrouskem, aby se snížilo odpařování.
- II. Obvyklým způsobem připravte buněčnou suspenzi. Použijte přibližně  $3 \cdot 10^6$  buněk·ml<sup>-1</sup>. Vzhledem k malé výšce pozorované oblasti je tato vysoká koncentrace nutná.
- III. Uzavřete plnicí porty C, D, E a F zátkami. Pro manipulaci se zátkami použijte vhodnou pinzetu.
- IV. Použijte 20 μl pipetu a aplikujte 6 μl buněčné suspenze do plnicího portu A.
- V. Ihned poté, s použitím stejného nastavení pipety, aspirujte vzduch z protějšího plnicího portu B (6 μl). Špičku pipety vložte přímo do portu. Kapalina z otvoru A bude nasána dovnitř a vyplní šterbinu homogenně. Nasávejte, jen dokud nedosáhne kapalina špičku pipety v protějším portu. Pokud je potřeba, vyrovnejte výšku kapaliny v obou plnicích otvorech a nechte je naplněné (viz Obr. 17).
- VI. Opatrně vyjměte všechny zátky z plnicích portů C, D, E a F. Uzavřete sklíčko kultivačním víkem.

Sklíčko je dále inkubováno uvnitř sterilní a vlhké atmosféry, aby se minimalizovalo odpařování, dokud buňky neadherují. Je nutné zajistit minimální odpařování přidáním vlhkého sterilního ubrousku vedle sklíčka v Petriho misce. [10]



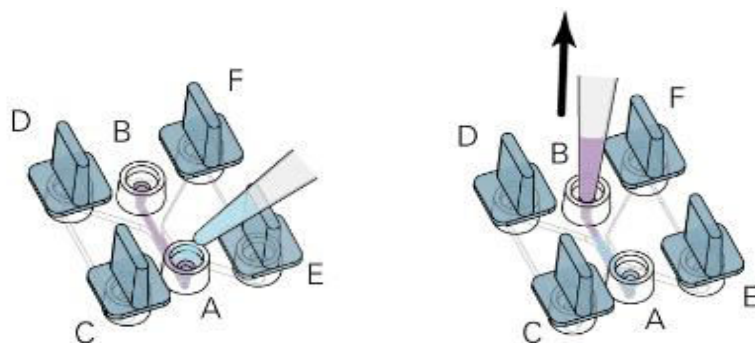
Obr. 17: Nasazení buněk (vlevo), výška kapaliny v plnicích portech (vpravo)

### 6.1.2. Kontrola adheze buněk

Během buněčné adheze se kontroluje buněčná morfologie pod optickým mikroskopem. Také je nutné kontrolovat rychlost odpařování – zajistit dostatečné množství kapaliny ve štěrbině, kde jsou nasazeny buňky, i v portech A a B. K buněčné adhezi by mělo dojít za přibližně stejnou dobu jako při obvyklé inkubaci adherentních buněk.

Pro pokračování v experimentu je doporučeno odstranění neadherovaných buněk a media. Postup je popsán zde. [10]

- I. Opatrně uzavřete plnicí porty C, D, E a F zátkami.
- II. Přidejte 10  $\mu$ l media do portu A. Dejte pozor na vniknutí bublin do roztoku. Nepipetujte přímo.
- III. Odsajte stejné množství kapaliny (10  $\mu$ l) z portu B.
- IV. Opakujte krok II a III.
- V. Plnicí porty A a B jsou naplněny médiem. Pokud je potřeba, vyrovnejte výšku kapaliny v obou portech.
- VI. Opatrně odstraňte zátky v plnicích portech C, D, E a F. Uzavřete porty A a B. [10]

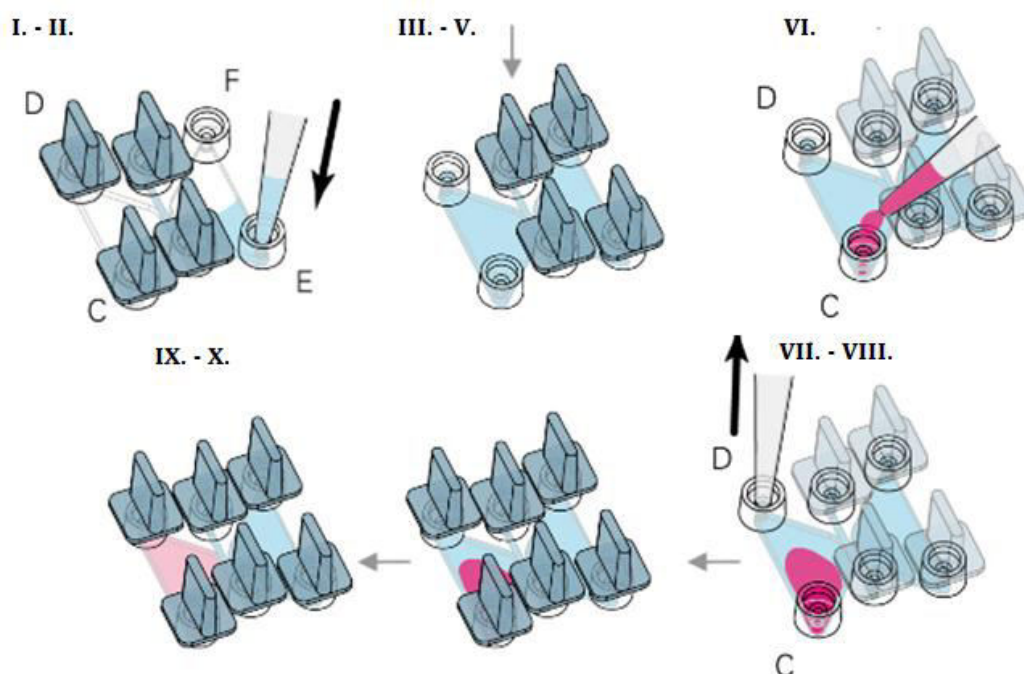


Obr. 18: Odstranění neadherovaných buněk [10]

### 6.1.3. Aplikace chemoatraktantu

- I. Opatrně uzavřete porty C a D zátkami. Do této části bude později aplikován chemoatraktant.
- II. Skrz plnicí port E přidejte 65  $\mu$ l media. Zvolte vhodnou pipetu a špičku pipety tak, aby kapalina neunikala mimo plnicí port. Komora musí být zcela vyplněná médiem, ale nesmí být přeplněná.
- III. Přeneste zátky z portů C a D do portů E a F a uzavřete tak stranu bez chemoatraktantu.
- IV. Přidejte 65  $\mu$ l media skrz plnicí port C.
- V. V této fázi jsou obě komory vyplněny pouze médiem bez chemoatraktantu a buňky rostou v pozorované oblasti rovnoměrně.
- VI. Nyní aplikujte 15  $\mu$ l chemoatraktantu do horní části portu C jak je znázorněno na obrázku (viz Obr. 19VI) – nepipetujte přímo.
- VII. Stejnou pipetou nasajte 15  $\mu$ l kapaliny z protějšího portu D. Chemoatraktant tak postupně vyplní komoru.

- VIII. Opakujte krok VI a VII, aby byla komora naplněna celkem 30  $\mu$ l chemoatraktantu. Nyní je 30  $\mu$ l naředěno 30  $\mu$ l neutrálního media.
- IX. Opatrně uzavřete všechny plnicí porty.
- Celý postup přidávání chemoatraktantu je znázorněný na obrázku níže s označenými fázemi podle protokolu (viz Obr. 19).



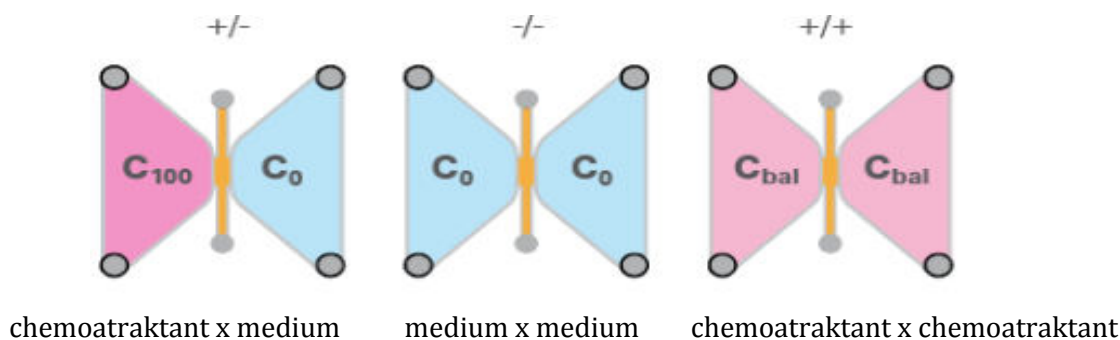
Obr. 19: Aplikace chemoatraktantu [10]

#### 6.1.4. Kontrolní experimenty

První komora sklíčka *μ-Slide Chemotaxis* je naplněna podle postupu popsaného výše. Abychom byli schopni zhodnotit, zda buňky reagují na chemoatraktant pozitivně a migrují správným směrem, provádíme také kontrolní experimenty. Ty probíhají vždy současně s aktivní chemotaxí a určují dosažení optimálních výsledků.

První kontrolní vzorek neobsahuje chemoatraktant v žádné ze svých dvou komor. Ty jsou naplněny pouze médiem pro výživu buněk. Buňky by tedy neměly mít specifický směr migrace a měli bychom pozorovat rovnoměrný pohyb do všech stran. Druhý kontrolní vzorek naopak obsahuje chemoatraktant v obou komorách, takže buňky by se měly pohybovat opět rovnoměrně, protože chemický gradient na ně působí do obou stran. [10]





Obr. 20: Obsah rezervoárů během experimentu [10]

## 6.2. Transwell migrační test

Vzhledem k tomu, že se protokol *μ-Slide Chemotaxis* prokázal jako nevhodný pro účely této diplomové práce zejména kvůli velikosti buněk, bylo nutné provést náhradu jinou vhodnější metodou. Byl zvolen *Transwell* migrační test. Jeho princip je popsán výše v kapitole *Transwell* migrační testy. Tato metoda nabízí poměrně snadnou aplikaci buněk a zároveň dobrý přístup ke komůrce s chemoatraktantem. Buňky jsou přitom umístěny v horní závěsné komůrce, takže i když migrují přes porézní membránu, k poškození buněk na spodní straně nedochází, protože membrána se nedotýká dna jamky. Pro experimenty byla použita sterilní 24jamková destička *Transwell*® s velikostí pórů 8  $\mu\text{m}$  a s inzerty s polykarbonátovou membránou o průměru 6,5  $\text{mm}^2$  (*Corning*®, číslo produktu 3422). Tloušťka membrány je 10  $\mu\text{m}$  a velikost povrchu pro nasazení buněk je 0,33  $\text{cm}^2$ . Hustota pórů je průměrně  $10^5$  pórů· $\text{cm}^{-2}$ . Průhledná polyesterová membrána je ošetřena kolagenem pro optimální adhezi a růst buněk. Tyto inserty poskytují lepší viditelnost buněk pod fázovým a konfokálním mikroskopem a umožňují tak dobré vyhodnocení. [50]

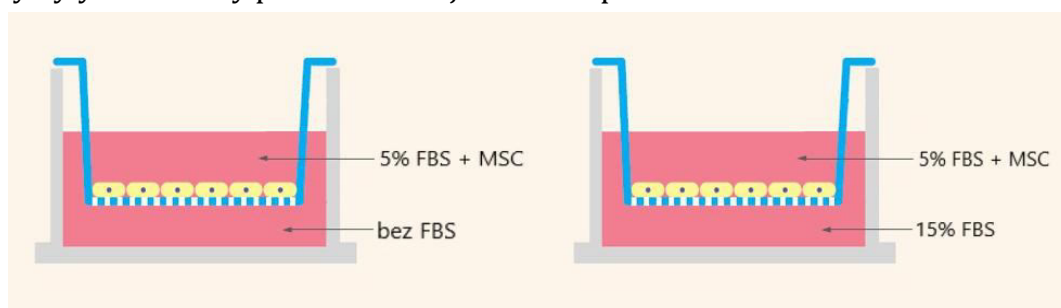
### 6.2.1. Transwell I

V prvním experimentu *Transwell* bylo použito FBS jako chemoatraktant. Proto bylo nejdříve namícháno živné medium v několika koncentracích FBS. Do 50 ml bezsérového DMEM bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  penicilinu, takže jeho výsledná koncentrace byla 1%. Poté bylo přidáno 2,5 ml FBS tak, aby byla výsledná koncentrace 5%. Chemoatraktant s koncentrací 30% byl získán přidáním 3 ml FBS do 16,8 ml DMEM a 200  $\mu\text{l}$  penicilinu. Poslední negativní kontrola byla jen smíchání 19,8 ml DMEM a 200  $\mu\text{l}$  penicilinu, takže toto živné medium neobsahovalo chemoatraktant a bylo použito jako negativní kontrola. [50]

Do jedné *Transwell* jamky v 24jamkové destičce bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  media bez FBS a do druhé jamky 500  $\mu\text{l}$  media s 15% FBS. Tak byly nachystány spodní komůrky *Transwell* testu. Poté proběhlo standardní barvení buněk CMFDA před pasáží. Výsledkem pasáže bylo 700  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze. Do připravených jamek *Transwell* destičky byly přeneseny inzerty a do každé bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  buněk. Jamky s konkrétními koncentracemi FBS jako chemoatraktantu jsou znázorněny na obrázku níže (viz Obr. 21). Do zbylé suspenze buněk bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  živného media, a to bylo

rozděleno na konfokální misky pro kontrolu proliferace buněk. Když byly do více jamkového pole přidány buňky, destička byla umístěna do inkubátoru, kde byly buňky při vhodných podmínkách 24 hodin inkubovány. Poté byly inzerty opatrně přeneseny na konfokální misku, a tak přeneseny na konfokální mikroskop. Následně byla získána data po 24 hodinách od nasazení buněk. *Transwell* destička pak byla opět umístěna do inkubátoru na dalších 24 hodin. Poté byly buňky opět skenovány a byla získána data po 48 hodinách od nasazení buněk.

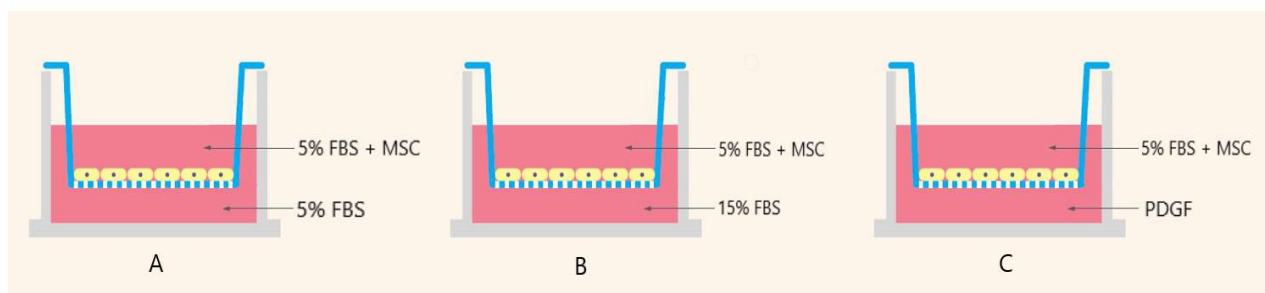
Při získávání dat na konfokálním mikroskopu se postup u experimentu *Transwell* I od zbylých lišil tím, že inzerty s membránou byly před skenováním přeneseny na konfokální misku. Tím byla zajištěna větší stabilita a nedocházelo k samovolnému posunu roviny Z. Nicméně položením insertu na misku mohlo dojít k poškození buněk ze spodní strany membrány, proto v dalších experimentech již tato miska nebyla použita a inzerty byly skenovány přímo ve více-jamkovém poli.



Obr. 21: Obsah jamek v experimentu *Transwell* I

### 6.2.2. *Transwell* II

Ve druhém experimentu byly použity chemoatraktanty FBS a PDGF-BB, přičemž 15% FBS byla pozitivní kontrola a 5% FBS byla negativní kontrola chemotaxe tak, jak je znázorněno na obrázku níže (viz Obr. 22). Tyto chemoatraktanty se stejnou koncentrací byly použity i pro další experimenty.



Obr. 22: Obsah jamek v experimentech *Transwell* II – IV; A – negativní kontrola; B – pozitivní kontrola; C – aktivní chemoatraktant PDGF-BB

Nejdříve byla připravena finální koncentrace PDGF, a to  $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , přičemž použité PDGF bylo s koncentrací  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Smícháním 1 ml DMEM s 5% FBS a  $0,02 \text{ }\mu\text{l}$  připraveného PDGF byl získán chemoatraktant s požadovanou koncentrací. Do tří jamek *Transwell* destičky bylo přidáno postupně  $500 \text{ }\mu\text{l}$  živného media s 5% FBS, 15% FBS a

PDGF a do jamek byly vloženy inzerty. Poté proběhlo pasážování buněk s barvením CMFDA a do každého inzertu bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze.

Opět byla získána data z konfokálního mikroskopu po 24 a po 48 hodinách od nasazení buněk. Poté byla barvena jádra a buňky zafixovány. Jádra byla značena fluorescenčním barvivem DAPI, které bylo připraveno v koncentraci 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Medium obsahující DAPI o objemu 500  $\mu\text{l}$  bylo přidáno do nové jamky ve 24jamkovém poli. Následně byl vložen inzert s buňkami, kde bylo odsáno medium a přidáno také medium s barvivem DAPI. Takto byla destička uložena do inkubátoru po dobu 15 minut. Poté se inzerty s buňkami i spodní jamky propláchly PBS a svrchní strana membrány byla setřena vatovou tyčinkou, abychom odstranili co nejvíce buněk na svrchní straně a zachovali buňky na spodní straně membrány, kde jsou jen buňky migrované. Tím se zajistí naskenování pouze této části a bude možné vyhodnocovat jen ty MSC, které prošly membránou. Takto zbavené inzerty svrchní vrstvy buněk byly fixovány pomocí paraformaldehydu, který byl přidán do jamek (500  $\mu\text{l}$ ) a do inzertů (300  $\mu\text{l}$ ) na minimálně 30 minut. Poté byl paraformaldehyd odstraněn a nahrazen PBS, ve kterém buňky zůstávají fixovány s možností dalšího skenování na konfokálním mikroskopu.

### **6.2.3. Transwell III a IV**

Nasazení MSC probíhalo stejně jako v předchozím experimentu (viz *Transwell II*). Kultivační medium s 5% FBS bylo použito jako negativní kontrola, 15% FBS jako pozitivní kontrola a PDGF jako použitý chemoatraktant. Protokol se lišil až po 48 hodinách, kdy byly jamky po druhé naskenovány. Buněčná jádra nebyla nabarvena před fixací, ale až po ní. Tato varianta se ukázala jako vhodnější, protože barvivo nebylo tak výrazně rozptýleno v cytoplazmě a bylo většinou distribuováno v jádře.

Nejdříve byly buňky promyty PBS a na 30 minut byl přidán paraformaldehyd. Poté byl odstraněn a byl přidán Triton X na dobu ne delší, než 5 minut. Tím došlo k naleptání membrány, triton byl rychle odstraněn a buňky byly propláchnuty PBS. Poté bylo přidáno DAPI v koncentraci 10  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu alespoň 30 minut. Nakonec bylo barvivo nahrazeno PBS.

## 7. SBĚR A ZPRACOVÁNÍ DAT

Vzorky byly snímány konfokálním mikroskopem Leica TCS SP8 X. Buňky experimentu *Transwell* I migračního testu byly skenovány po 24 a 48 hodinách po nasazení. Další experimenty *Transwell* II až IV byly navíc skenovány po seškrábnutí povrchu membrány. Skenování probíhalo po jednotlivých polích. Velikost těchto polí je dána zvětšením mikroskopu. Abychom získali celou plochu membrány a ne jen její část, bylo zvoleno zvětšení 10x. Pro zpracování a vyhodnocení jsme tak získali 36 polí s překryvem 10%. Mikroskop přitom využívá softwarové prostředí LAS X. Data byla pro každý experiment extrahována zvlášť a uložena do složek podle doby skenu (sken po 24 hodinách, 48 hodinách a po seškrábnutí). Velikost pixelu přitom odpovídá  $1,136\text{ }\mu\text{m}$  a jeho plocha  $1,29\text{ }\mu\text{m}^2$ . Pro dodatečné vyhodnocení byly také pořízeny snímky při zvětšení 63x. Nebyla tak naskenována celá plocha membrány, ale pouze její vybrané části. Při tomto zvětšení lze lépe nastavit Z roviny a z jednotlivých řezů rekonstruovat 3D snímek přímo v softwaru mikroskopu. [49]

### 7.1. Zpracování obrazů

Pro správné vyhodnocení je potřeba získat z naskenovaných obrazů potřebné informace. Tato práce je zaměřena zejména na počet pórů v membráně, procentuální pokrytí buněk na povrchu (výpočet konfluence) a počet jader, které prošly póry v membráně. To, proč byly zvoleny právě tyto informace, bude popsáno v následující kapitole.

Zpracování probíhalo v programovacím prostředí Matlab R2020a pomocí *Image Processing Toolbox™*, který poskytuje řadu nástrojů pro zpracování a analýzu obrazů. Mimo jiné umožňuje převod obrazu na binární a prahováním segmentovat požadované části. Zejména tento proces byl využit pro účely této práce. Pro zpracování byla použita tzv. raw data fluorescenčních obrazů, tedy šedotónové osmibitové obrazy naskenované mikroskopem bez použitého pseudobarvení. To je softwarově automaticky přidáváno a zobrazováno také, takže lze exportovat i RGB obrazy (např. buňky naskenované díky fluorescenci barviva CMFDA jsou softwarově obarvena podle vlnové délky emise tohoto fluorescenčního barviva), které nebyly v této práci pro zpracování použity.

Pro zpracování získaných dat byly vytvořeny skripty, které v prvním kroku načítají obrazy a poté volají funkci podle požadovaných informací a parametrů. Poté jsou ve skriptech provedena vyhodnocení většinou ve formě sloupcových grafů nebo tabulek.

#### 7.1.1. Počet pórů v obraze

Pro počítání pórů v membráně, kterými buňka prošla, byla vytvořena funkce *Nalezeni\_poru*. Před tím, než je tato funkce volaná, je nutné přepnout do složky, ve které se nacházejí obrazy z daného experimentu. To je provedeno pomocí příkazu *cd*, který zobrazí v pracovním prostředí zvolenou složku s daty. Poté je nutné zvolit jen obrazy s fluorescencí, které byly naskenovány konfokálním mikroskopem a uloženy jako obrazy

z kanálu 0 („ch00“). Pomocí funkce *dir* se vytvoří seznam právě těchto obrazů. Jejich celkový počet zjistíme vypočtením délky tohoto seznamu (funkce *length*). Následující *for* cyklus načte všechny obrazy z kanálu 0 z jednoho experimentu pomocí funkce *imread*. Ještě před voláním funkce pro nalezení pórů je zvolen práh. Obrazy jsou prahovány tak, aby byly zachovány jen požadované informace, jako jsou celé buňky a jejich části, a ostatní byly odstraněny.

To je provedeno ve funkci *Nalezeni\_poru*. Jejím vstupem jsou jednotlivé obrazy z daného experimentu, jejich počet a práh. V prvním kroku jednotlivé obrazy vstupují do *for* cyklu, kde jsou ponechány jen ty pixely, které mají větší hodnotu, než předem definovaný práh. Z tohoto prahování je vytvořena maska tak, že všechny pozice, které mají větší hodnotu než práh, jsou nastaveny na nulu. Dále je nutné upravit velikost této masky. To z toho důvodu, že původní obrazy z konfokálního mikroskopu jsou vždy skenovány s 10% překryvem. Aby tedy nedocházelo např. k počítání póru vícekrát, je nutné s těmito 10% počítat při dalším postupu. Nejdříve jsou zjištěny rozměry masky pomocí funkce *size*. Z těchto rozměrů je vypočítáno 5, resp. 95%. Následně je znovu vytvořena maska s těmito upravenými rozměry – nová maska obsahuje pouze pixely, které jsou na pozicích od 5% do 95% původní masky. Tyto upravené masky všech obrazů jsou výstupem z *for* cyklu a vstupují do dalšího *for* cyklu. Před ním jsou definované prahy *P\_1* a *P\_2* pro odstranění objektů. To se děje pomocí funkce *bwareaopen*, která odstraní všechny objekty v obraze s menším počtem pixelů než *P\_1*, empiricky nastaveným na hodnotu 11. Naopak dále ponechá jen ty objekty, které mají menší počet pixelů než práh *P\_2*, nastaven empiricky na hodnotu 100. Aby bylo možné zjistit další informace o daných vybraných oblastech, nejdříve jsou obrazy převedeny na černobílé příkazem *imbinarize*. Následně jsou zjištěny centroidy všech nalezených objektů pomocí funkce *regionprops*. Aby bylo možné s těmito daty dále pracovat, informace o centroidech byly převedeny do vektoru. Výstupem jsou tedy póry v membráně, avšak pouze ty, kterými prošla buňka, a jsou vizualizovány fluorescenčním barvivem silněji než jiné oblasti. Tyto póry lze vykreslit společně s jejich centroidy, které nalezené póry vyznačí. Pro správné vykreslení je potřebné počítat s původními rozměry obrazu, nikoli s upravenou maskou.

Tímto způsobem je volána funkce pro nalezení pórů pro každý experiment zvlášť. Poté je nutné provést vyhodnocení, ke kterému je potřebné znát také počet pórů. Ten je počítán jednoduchou funkcí *pocet\_poru*, jejímž vstupem jsou nalezené centroidy a výstupem již zmíněný počet pórů. Ten je počítán v každém obraze, resp. masce pomocí příkazu *length*, který zjistí délku centroidů tvořící vektor (jednotlivé pozice centroidů). Součtem délek všech těchto vektorů tedy zjistíme počet pórů v obraze.

### 7.1.2. Počet jader

V experimentech *Transwell* III a IV byla metoda optimalizována obarvením buněčných jader kvůli zjištění jejich počtu na druhé straně membrány (více o této optimalizaci v následující kapitole 8). Algoritmus využívá podobného principu, jako předcházející

hledání pórů. Nejdříve je nutné stejným způsobem načíst obrazy, nicméně tentokrát jsou načteny fluorescenční obrazy jader, nikoli celých buněk. Pro určení počtu jader je volána funkce *Nalezeni\_jader*. Jejím vstupem jsou opět obrazy z jednotlivých experimentů a jejich počet. Výstupem je počet buněčných jader. Stejným způsobem jako v předchozí funkci, v prvním kroku jsou definovány prahy pro určení oblastí zájmu. P\_1 je empiricky nastaven na hodnotu 70, P\_2 na hodnotu 450 pixelů. Obrazy vstupují do *for* cyklu, kde jsou nejprve převedeny na černobílé pomocí funkce *imbinarize*. Poté jsou příkazem *bwareaopen* odstraněny menší objekty než práh P\_1 a zároveň větší objekty než práh P\_2. Stejným způsobem, jako při hledání pórů v obraze, jsou dále upraveny rozměry získané matice BW tak, aby odpovídala 90% rozměru původního obrazu. Poté je volána funkce *regionprops*, kde jsou zjištěny informace o všech nalezených oblastech pomocí parametru 'Area'. Zjištěním počtu těchto oblastí je získána informace o počtu jader, vzhledem k tomu, že prahy byly nastaveny tak, aby každá oblast odpovídala jednomu jádru. Jejich celkový počet je vypočítán jako suma všech jader v jednotlivých obrazech.

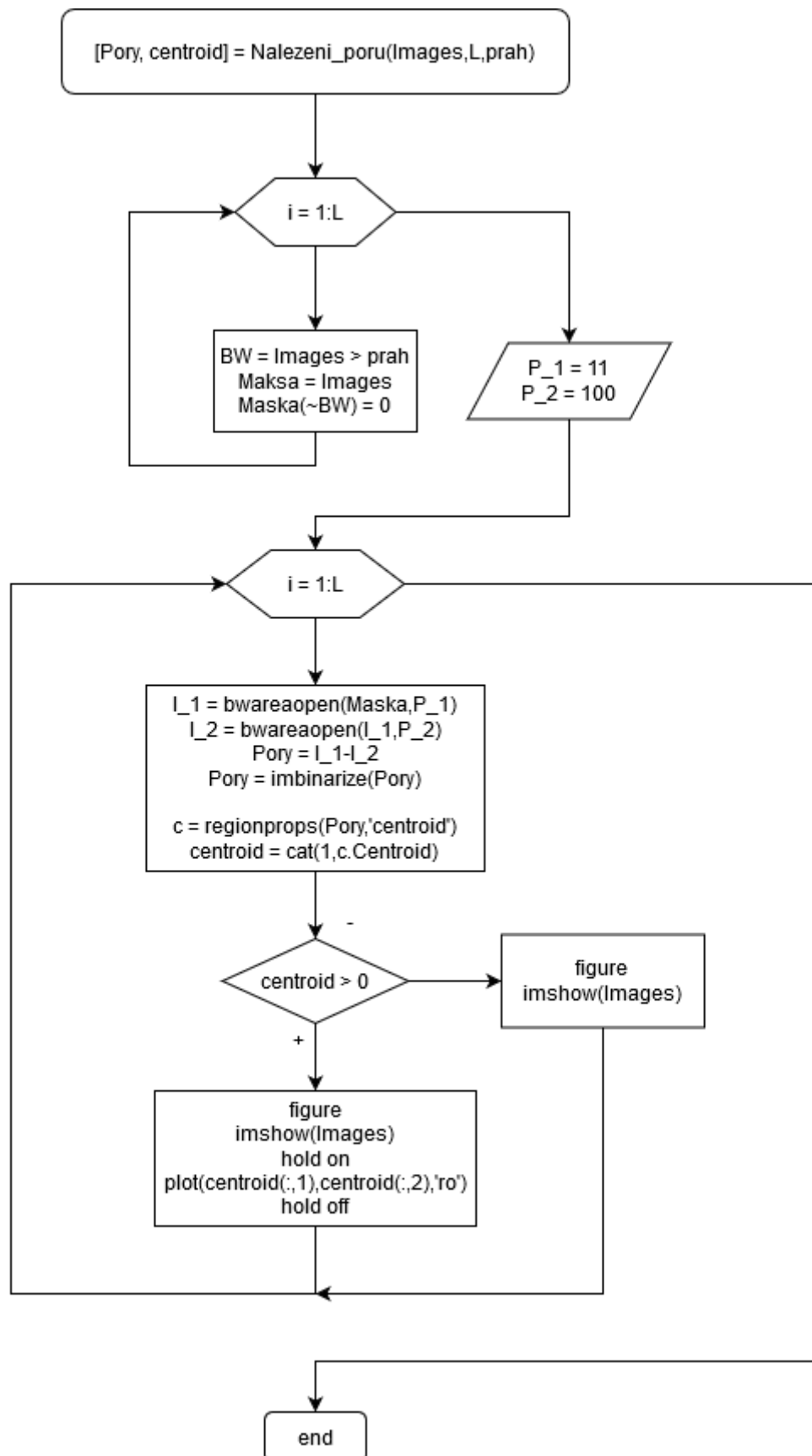
### 7.1.3. Výpočet konfluence

Posledním algoritmem pro vyhodnocení je funkce *Vypocet\_konfluence*. Díky této informaci lze získat několik užitečných parametrů. Za prvé, pokud je známá konfluence buněk na membráně, je možné lépe vyhodnotit efektivitu předcházejících algoritmů. Např. pokud je konfluence větší v přítomnosti FBS 5% než PDGF-BB (mohlo být nasazeno větší množství buněk), počet detekovaných pórů, případně i jader, bude také značně ovlivněn. Proto je nutné tento parametr brát v úvahu při vyhodnocování zejména počtu pórů. Dále je výpočet konfluence užitečným nástrojem pro určení množství buněk na opačné straně membrány. Nejen znalost o počtu jader, ale také velikost konfluence je jasným ukazatelem toho, že buňka migrovala skrze membránu. Navíc pokud zjistíme konfluenci na obou stranách membrány, lze vyhodnotit závislost adheze buněk na přítomnost chemoatraktantu a porovnat ji s pozitivní a negativní kontrolou.

Tak jako u předchozích funkcí, před jejím voláním je nutné pomocí funkce *dir* vytvořit seznam obrázků ze složky, která se zobrazí příkazem *cd*. Vstupem do funkce *Vypocet\_konfluence* je seznam obrazů z jednoho experimentu, jejich počet a dva prahy. Práh T je hodnota pro převod do binárního obrázku a P je práh pro odstranění malých objektů. Oba prahy jsou určeny empiricky a jsou optimalizovány pro každý experiment. Ve funkci jsou nejdříve nastaveny na hodnotu 0 proměnné Cells a N, do kterých se dále ukládá počet bílých a černých pixelů. Černé pixely pak tvoří pozadí oproti bílým pixelům, které představují přítomnou buňku. Do *for* cyklu poté vstupuje seznam obrazů a jednotlivé obrazy jsou zde načítány pomocí funkce *imread* a převáděny do formátu double pomocí příkazu *im2double*. Poté jsou příkazem *imbinarize* převedeny na šedotónové s předem definovaným prahem T. Dále jsou obrazy upraveny uzavřením struktur, odstraněním menších objektů než práh P a vyplněním děr, použitím funkcí *bwboundaries* s parametrem 'holes', *bwareaopen* a *imfill*. Samotný výpočet konfluence začíná zjištěním velikosti rozměrů obrazu příkazem *size*. Poté se pomocí dvou *for* cyklů

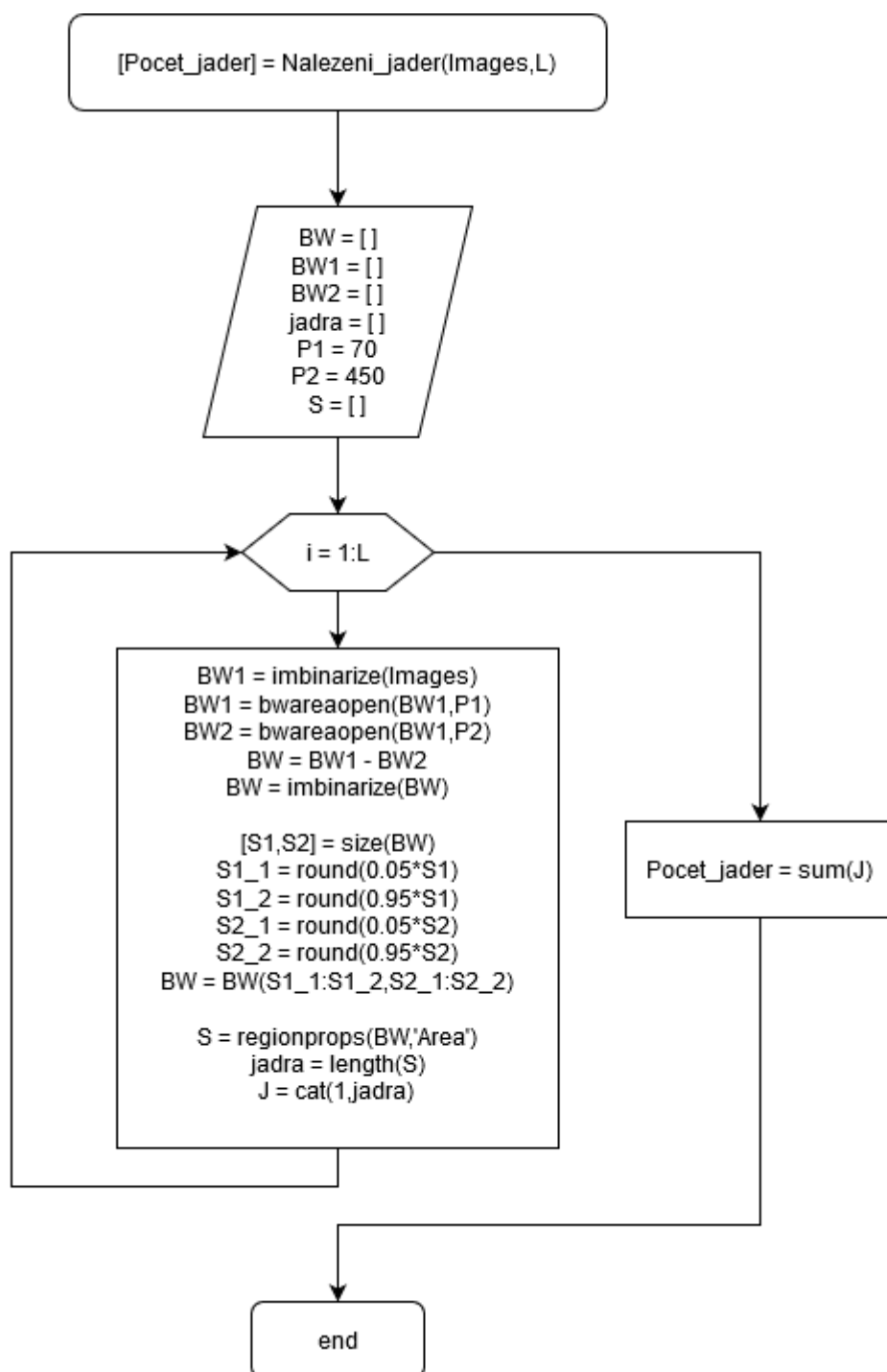
prochází obraz pozice za pozicí a zjišťuje se, zda se hodnota rovná 1 nebo 0. Pokud je hodnota rovna 0, přičte se k hodnotě N číslo 1. V opačném případě se k hodnotě Cells přičte 1. Tím je získán celkový počet bílých (na pozici je 1) a černých (na pozici je 0) pixelů. Celkové procento konfluence je poté vypočítáno jako poměr počtu bílých pixelů a celkového počtu pixelů násobený 100.

Tímto způsobem je počítáno procento konfluence pro každý experiment zvlášť a výsledky jsou zapsány do tabulky Vyhodnoceni.

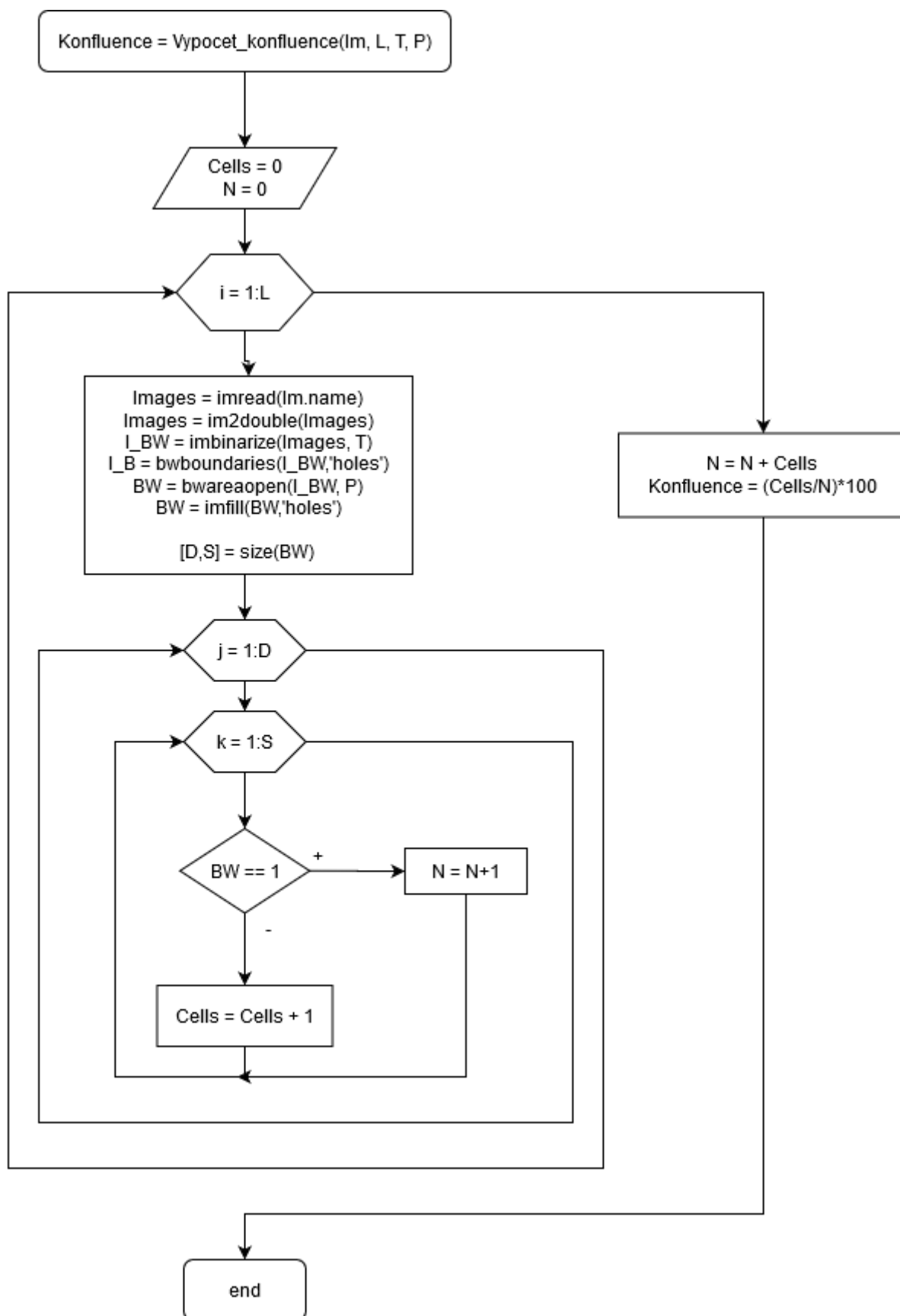


Obr. 23: Vývojový diagram funkce *Nalezeni\_poru*





Obr. 24: Vývojový diagram funkce *Nelezeni\_jader*



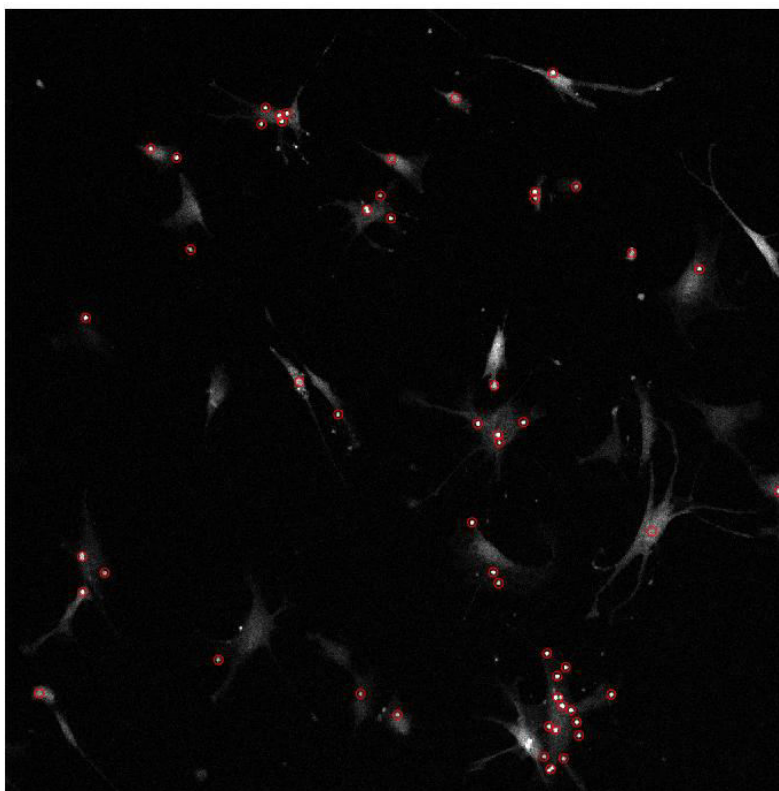
Obr. 25: Vývojový diagram funkce *Vypocet\_konfluence*

## 8. VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

Buněčnou migraci na principu chemotaxe lze studovat mnoha způsoby. Existuje celá řada metod, které se této problematice věnují a snaží se dosáhnout co neoptimálnějších výsledků. Některé z nich byly popsány v teoretické části této práce. V této kapitole jsou popsány výsledky všech provedených experimentů.

### 8.1. Vyhodnocení pomocí počtu pórů

Počet pórů, kterými prošla buňka, je počítán z toho důvodu, že buňka se pohybuje ze svrchní strany membrány na opačnou stranu díky aktivnímu pohybu. Velikost póru je přitom 8  $\mu\text{m}$  a velikost buňky kolem 250  $\mu\text{m}$ , takže pokud je buňka adherovaná, zabírá větší plochu membrány a může se pod ní nacházet několik pórů. Poté začne migrovat směrem k chemoatraktantu na druhou stranu membrány. Nepoužije k tomu však jen jeden pór, protože gradient chemoatraktantu je vytvořen všude stejný. Začne se tedy pohybovat více póry najednou. Většinou je však buňka příliš velká na to, aby prošla celá, a její část stále zůstává v pórech. Tím, že jsou buňky fluorescenčně značené, tedy můžeme tyto jejich části v pórech detekovat. Fluorescence je zde navíc většinou výraznější, než v ostatních částech obrazu, protože tato část buňky je v póru více „nahuštěná“. Cílem této práce bylo mimo jiné prokázat, že lze detekovat více buněčných částí v pórech, pokud se buňka pohybuje směrem k chemoatraktantu, než pokud ve spodní části žádný chemoatraktant není. Příklad této detekce z jednoho naskenovaného pole je na následujícím obrázku. (viz Obr. 26)

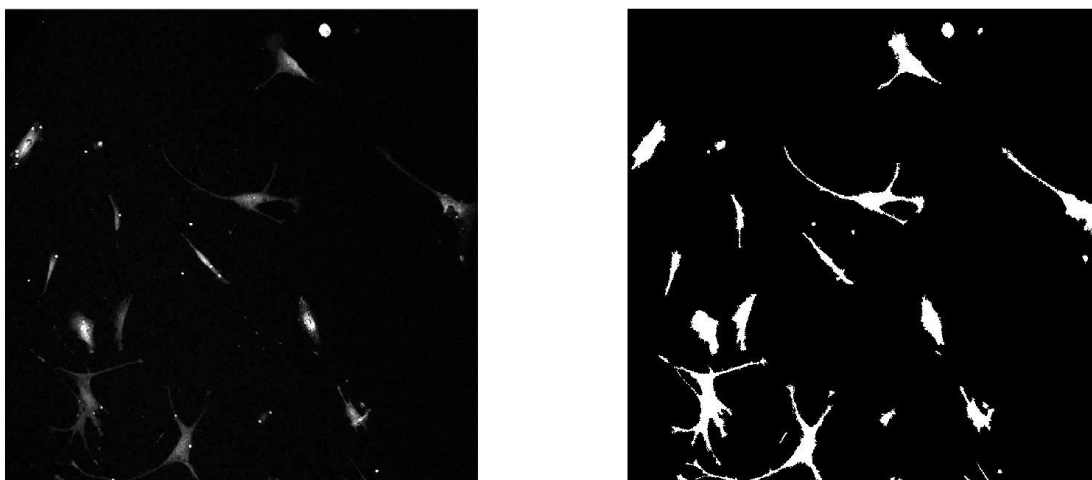


Obr. 26: Příklad detekce pórů v porézní membráně (póry vyznačeny červeně); na obrázku výsledek detekce z experimentu *Transwell III*

## 8.2. Vyhodnocení pomocí konfluence

Určení konfluence buněk na povrchu membrány je základním parametrem pro vyhodnocování. Je důležitá zejména při srovnání naskenovaných buněk před a po seškrábnutí membrány. Abychom získali data z celé plochy membrány, bylo zvoleno zvětšení 10x. Nicméně při tomto zvětšení nejsme schopni určit, na které straně membrány se buňky nacházejí. Proto byl zvolen následující postup. Nejdříve byla zjištěna celková konfluence před seškrábnutím membrány a poté po ní. Při hodnocení konfluence po seškrábnutí pak máme k dispozici jen data ze spodní strany membrány, takže lze vyhodnotit konfluenci v závislosti na použitém chemoatraktantu.

Nevýhodou je postupné vyhasínání fluorescenčního barviva, což může způsobovat to, že při skenování po více než 48 hodinách už fluorescence není tak výrazná jako po 24 hodinách. Některé buňky už například nemusí být zobrazeny mikroskopem. To může hrát roli při vyhodnocování a výsledky určitým způsobem ovlivňovat. V *Transwell* experimentech však byla fluorescence ještě i po více než 48 hodinách dostatečně viditelná a vyhodnocení tak mohlo být provedeno. Nicméně je nutné počítat s možnými odchylkami v závislosti na vyhasínání barviva.

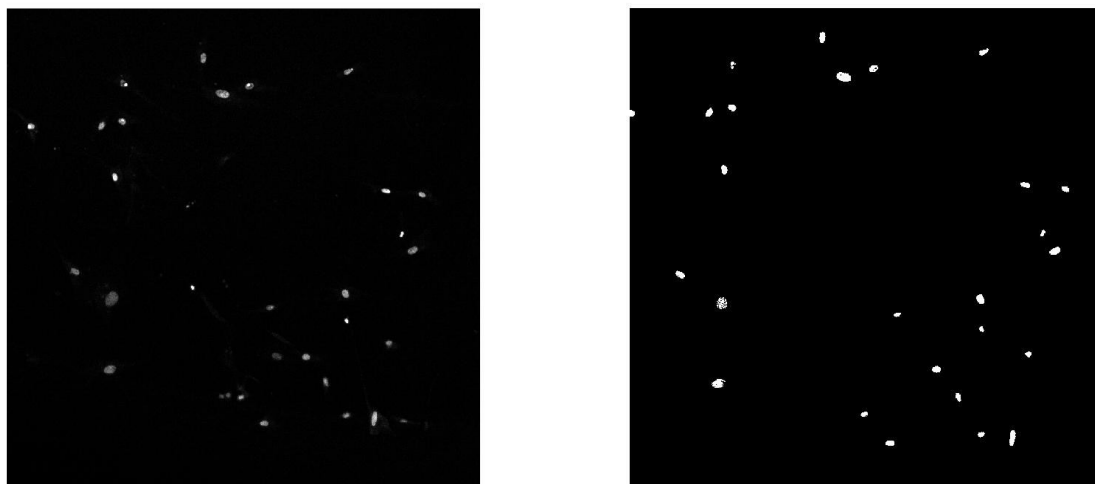


Obr. 27: Příklad vyhledávání buněk v obraze; původní obraz z konfokálního mikroskopu (vlevo), nalezené oblasti buněk pro výpočet konfluence (vpravo)

## 8.3. Vyhodnocení pomocí počtu jader buněk

I když vyhodnotíme počet pórů, kterými buňka migruje, a celkovou konfluenci na obou stranách membrány, stále nelze říct, zda buňka dokáže migrovat celá přes pórovitou membránu, tzn. včetně jádra. Poslední dva experimenty *Transwell* byly proto optimalizovány detekcí jader na spodní straně membrány. Jádra byla označena fluorescenčním barvivem DAPI až po seškrábnutí svrchní strany membrány, takže pokud by se v obraze opravdu nacházela jádra, mohli bychom konstatovat, že buňka migrovala celá i s jádrem na opačnou stranu směrem k chemoatraktantu. Dalším cílem je prokázat, zda je počet buněčných jader závislý na přítomnosti chemoatraktantu či nikoliv.

Pro účely detekce buněčných jader nejsou vyhodnocovány obrazy z celé plochy (celkově je získáno 36 jednotlivých polí), ale jen 12 obrazů ze střední oblasti membrány kvůli tomu, aby nedocházelo k ovlivňování výsledků. Seškrábnutí svrchní strany membrány totiž nelze provést na celé ploše, protože k okrajům membrány je velmi obtížné se dostat. Některé buňky u okrajů tedy zůstaly na vrchní straně i po seškrábnutí. Z toho důvodu byla pro následné vyhodnocování použita jen data, u kterých bylo možné říci, že jsou nasnímána správně. Z celkové plochy membrány  $0,33 \text{ cm}^2$  je tedy vyhodnocováno jen  $0,146 \text{ cm}^2$ .



Obr. 28: Příklad detekce jader; původní obraz z konfokálního mikroskopu (vlevo), detekovaná jádra (vpravo)

## 8.4. Výsledky experimentů

### 8.4.1. Výsledky *μ-Slide Chemotaxis*

V první polovině experimentální části byla zaměřena pozornost na chemotaxi pomocí nástroje *μ-Slide Chemotaxis*. Postup byl několikrát opakován a i přes snahu o optimalizaci byla tato metoda nakonec vyloučena jako nevhodná. Důvodem byly zejména rozměry MSC a jejich koncentrace. Buňky totiž dosahovaly velikosti kolem  $250 \text{ μm}$  a při kultivaci se nedělily dostatečně rychle na to, abychom získali potřebnou koncentraci. Do štěrby se aplikuje jen  $6 \text{ μl}$  buněčné suspenze a v takovém malém množství nebyl dostatečný počet buněk. Úspěšně se uchytilo jen pár MSC, což pro vyhodnocení této metody není dostačující. Další problém bylo vyplavení buněk ze štěrby, protože byly příliš velké na to, aby stihly adherovat, dokud bylo přidáno kultivační medium. Do bočních komůrek bylo totiž nutné po několika hodinách přidat živné medium, protože malé množství tekutiny ve štěrbině rychle vysychalo. Pokud by medium nebylo přidáno, buňky by neměly dostatek živin a ztratily by prostředí pro další růst a proliferaci. Po přidání media však byly neadherované buňky vyplaveny do bočních komůrek, takže nebylo možné dále hodnotit jejich migraci. Z těchto důvodů byla tato metoda v další části nahrazena *Transwell* migračními testy.

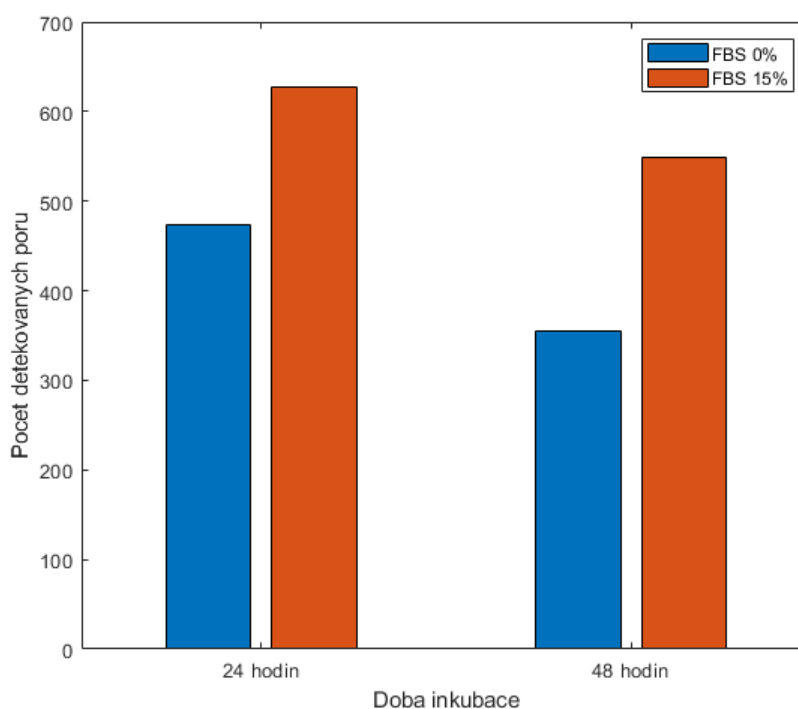
#### 8.4.2. Výsledky *Transwell* I

Jak již bylo popsáno výše, první experiment *Transwell* migračního testu byl proveden ve dvou *Transwell* jamkách – s 15% FBS a bez FBS. Cílem bylo prokázat, že FBS skutečně působí jako chemoatraktant a buňky více migrují směrem k jeho vyšší koncentraci. V tomto experimentu bylo provedeno vyhodnocení počtu pórů v jednotlivých jamkách a celková konfluence buněk.

Výsledky detekovaných pórů jsou nejlépe pozorovatelné v následující tabulce a grafu (viz Tab. 1, Obr. 29). Počet pórů je vyhodnocen pro obě jamky po 24 hodinách a po 48 hodinách. Cílem bylo srovnání jak pro jednotlivé jamky, tak pro časové rozestupy – srovnání po 24 a 48 hodinách. Z tabulky a grafu vidíme, že FBS opravdu vytváří gradient, jehož směrem se buňky pohybují. Počet pórů v membráně, kterými buňka prošla po 24 hodinách od nasazení buněk, je v případě přítomnosti FBS o 155 vyšší než bez FBS, což odpovídá asi 33% počtu pórů bez FBS. Po dalších 24 hodinách se tento rozdíl ještě zvýšil na 193, takže se počet detekovaných pórů zvýšil o 25%. V dalších experimentech je proto 15% FBS použito jako pozitivní kontrola chemotaxe a 5% FBS jako negativní kontrola.

**Tab. 1: Počet pórů a jejich rozdíl v experimentu *Transwell* I po 24 a 48 hodinách**

	24 hodin	48 hodin
<b>Počet pórů FBS 0%</b>	473	355
<b>Počet pórů FBS 15%</b>	628	548
<b>Rozdíl FBS15 – FBS0</b>	<b>155</b>	<b>193</b>



**Obr. 29: Graf vyhodnocení počtu pórů *Transwell* I; vlevo zobrazen počet pórů po 24 hodinách, vpravo po 48 hodinách**

V další tabulce (Tab. 2) jsou výsledky celkové konfluence buněk v jednotlivých experimentech. Jak již bylo popsáno výše, celková konfluence závisí na koncentraci nasazených buněk. Ta by však měla být pro každý experiment přibližně stejná. Z tabulky konfluence vidíme, že po 48 hodinách je její hodnota v obou případech nižší než po 24 hodinách. Jeden z důvodů může být menší fluorescence vzorků kvůli delší době působení excitačního světla. Dalším důvodem může být migrace buněk na druhou stranu membrány. Buňky tedy již nejsou v rovině zaostření, tedy nejsou viditelné v obrazech a nejsou detekovány. Takto by se podle očekávaných výsledků měly chovat zejména buňky pozitivní kontroly, protože ty mají větší tendenci pohybovat se směrem kladného gradientu. To však v tomto případě nelze říci, protože konfluence bez přítomnosti FBS je po 48 hodinách nižší o 1,5%, zatímco v přítomnosti FBS je to jen o 1,1%.

Informace o konfluenci buněk však bude více využita v následujících experimentech, kdy bude hodnocena konfluence před a po seškrábnutí vrchní strany membrány. Získáme tedy také informaci o konfluenci buněk, které prošly skrz membránu.

**Tab. 2: Konfluenci buněk v experimentech *Transwell I* po 24 a 48 hodinách**

	Konfluenci po 24 hod. [%]	Konfluenci po 48 hodin [%]
<b>FBS 0%</b>	3,4	1,9
<b>FBS 15%</b>	4,6	3,5

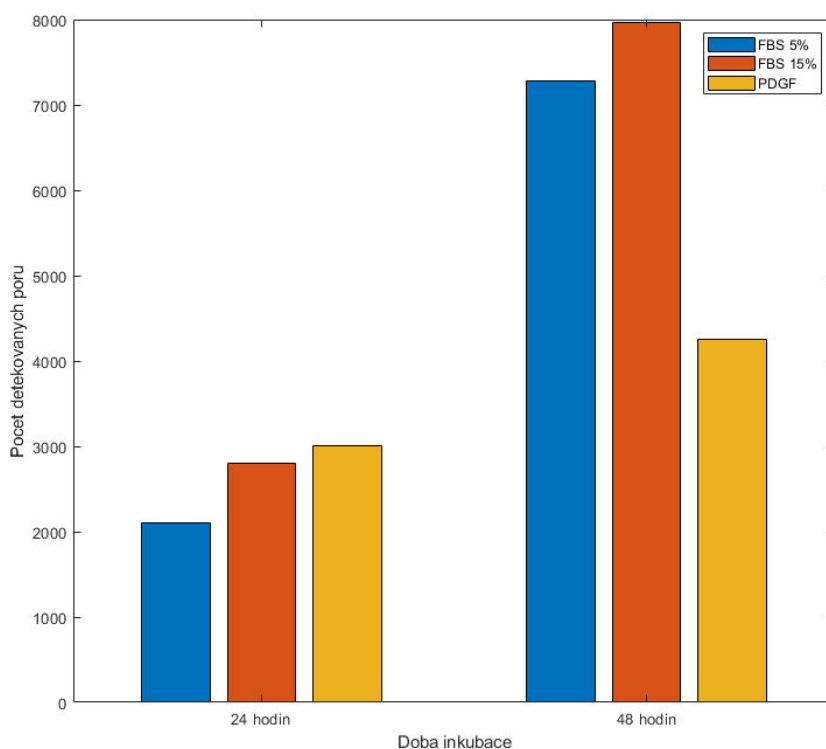
#### **8.4.3. Výsledky *Transwell II***

V dalších experimentech bylo přidáno PDGF-BB jako aktivní chemoatraktant. Jak již bylo popsáno výše, v jedné jamce bylo přidáno 5% FBS jako negativní kontrola, ve druhé 15% FBS jako pozitivní kontrola a ve třetí PDGF-BB. Skenování probíhalo po 24, 48 hodinách od nasazení buněk a po seškrábnutí svrchní strany membrány.

V první řadě bylo provedeno zhodnocení počtu nalezených pórů, kterými buňky prošly skrz membránu. V grafu níže jsou zobrazeny výsledky (viz Obr. 30). Vidíme, že počet nalezených jader se značně liší po 24 hodinách a po 48 hodinách. Důvodem může být kvalita naskenovaných obrazů. Na rozdíl od *Transwell I* se obrazy lišily zejména v konfluenci buněk. Ta byla značně vyšší v experimentu *Transwell II*, a proto je i větší počet detekovaných pórů. Navíc při skenování často dochází k posunu osy Z, takže obrazy po 24 hodinách nejsou nasnímány rovnoměrně. To způsobuje, že je část obrazu viditelná lépe a část hůř. Nicméně práh je při zpracování stále stejný, takže v některých obrazech jsou detekovány jen určité části. Právě proto je po 24 hodinách detekováno méně pórů než po 48 hodinách. Pokud však hodnotíme pouze počet pórů po 24 hodinách, vidíme jasnou závislost v přítomnosti chemoatraktantu a bez něj. V přítomnosti PDGF-BB je detekováno 30% pórů více než s 5% FBS. Buňky tedy ochotněji migrují přes póry, pokud se pohybují směrem k chemoatraktantu.

Po 48 hodinách od nasazení buněk byly vzorky přizpůsobeny a naskenovány lépe. Vidíme však, že počet pórů s PDGF-BB je nižší při negativní kontrole, a to o téměř 42%.

Jeden z možných důvodů je opět posunutí osy Z, protože data s PDGF-BB nejsou nasnímána zcela rovnoměrně jako v případě 5% a 15% FBS. Dalším důvodem může být to, že části buněk již nejsou v pórech přítomny, ale migrovaly na druhou stranu membrány včetně jádra. To je velmi pravděpodobné, protože z předchozích výsledků víme, že MSC se v přítomnosti PDGF-BB pohybují více. Proto byla k posledním dvěma experimentům přidána detekce jader po škrábnutí svrchní strany membrány.



**Obr. 30: Graf vyhodnocení počtu pórů *Transwell* II; v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách**

Dále proběhlo vyhodnocení pomocí konfluence. Tyto výsledky jsou zobrazeny v tabulce níže (viz Tab. 3). Jak již bylo zmíněno, konfluence se značně liší po 24 a po 48 hodinách. To ovlivňuje další parametry, jako je detekce pórů. Po 48 hodinách byla osa Z upravena a obrazy byly snímány v lepší kvalitě, proto se hodnota konfluence tak liší po tomto časovém odstupu.

Pokud provedeme srovnání konfluence po 48 hodinách a po odstranění horní části membrány, vidíme určitou závislost. Zatímco v přítomnosti 5% FBS je hodnota konfluence nejvyšší po 48 hodinách, a to až 72,6%, po seškrábnutí membrány je naopak nejnižší. Naopak v porovnání s PDGF-BB s nejmenší konfluencí 51,8% po 48 hodinách, ale s nejvyšší konfluencí 13,1% po seškrábnutí membrány, je tak srovnatelná s pozitivní kontrolou a lze z toho vyvodit následující závěry. V případě negativní kontroly buňky nejsou tolik motivovány k pohybu a zůstávají tedy z velké části na vrchní straně membrány s minimálním pohybem skrz membránu. Naopak v přítomnosti chemoatraktantu (a pozitivní kontroly) buňky aktivně přes membránu migrují, a detekujeme tedy větší procento buněk na spodní straně membrány.

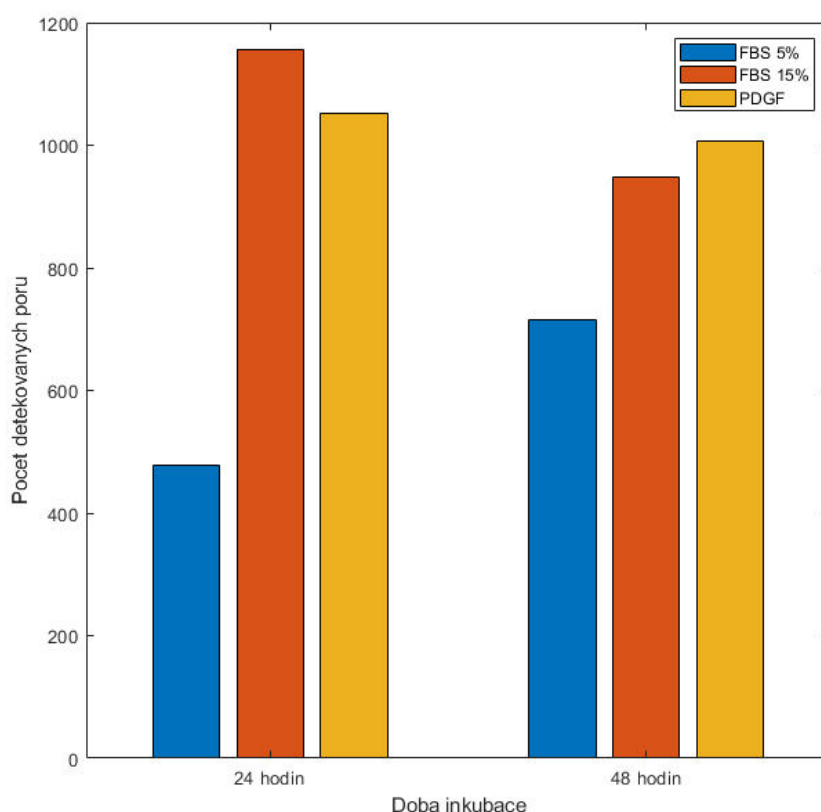


**Tab. 3: Konfluence experimentu *Transwell* II po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány**

	Konfluence po 24 hod. [%]	Konfluence po 48 hod. [%]	Konfluence po seškrábnutí [%]
<b>FBS 5%</b>	13,6	72,6	3,6
<b>FBS 15%</b>	27,5	66,9	13,3
<b>PDGF-BB</b>	20,4	51,8	13,1

#### 8.4.4. Výsledky *Transwell* III

I v tomto experimentu je patrná závislost migrace buněk přes membránu s chemoatraktantem. Počet pórů s 5% FBS je nižší než s 15% FBS i PDGF-BB. V tomto případě jsou výsledky pozitivní kontroly a PDGF-BB srovnatelné. Z grafu vidíme, že po 24 hodinách bylo detekováno jen o 9% méně pórů s chemoatraktantem než s 15% FBS. Po 48 hodinách je naopak počet pórů ještě o 6% vyšší v případě PDGF-BB a o 29% vyšší než při negativní kontrole. (Obr. 31)



**Obr. 31: Graf vyhodnocení počtu pórů *Transwell* III, v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách**

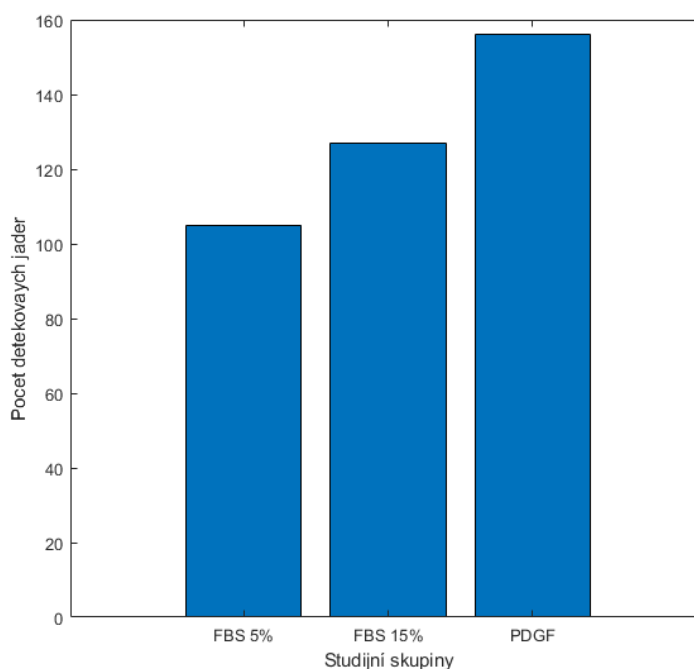
Procenta konfluence jsou v tomto experimentu nižší a jsou vypsány do následující tabulky. Přesto lze pozorovat závislost na přítomném chemoatraktantu. Při srovnání 24 a 48 hodin pozorujeme nárůst konfluence buněk průměrně o 1,9%. Buňky se mohou

dělit a konfluence poté stoupá. Co se týká srovnání po seškrábnutí, vidíme nejvyšší procento u PDGF-BB, a to o 1,2% větší konfluence než při negativní kontrole. MSC tedy opět pokryly druhou stranu membrány nejvíce v přítomnosti chemoatraktantu. (viz Tab. 4).

**Tab. 4: Konfluence experimentu *Transwell* III po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány**

	Konfluence po 24 hod. [%]	Konfluence po 48 hod. [%]	Konfluence po seškrábnutí [%]
<b>FBS 5%</b>	4,4	7,6	1,6
<b>FBS 15%</b>	6,6	8,1	2,1
<b>PDGF-BB</b>	6,7	7,6	2,8

Pro lepší vyhodnocení buněčné migrace bylo do zpracování přidáno vyhodnocení počtu jader na spodní straně membrány. Data byla získána obarvením buněčných jader a odstraněním buněk na vrchní straně, čímž byla při pořizování snímků získávána jen data právě těch buněk a jader, které migrovaly přes membránu. Výsledky jsou opět vyneseny do sloupcového grafu (viz Obr. 32). Závislost na použitém chemoatraktantu je zde opět patrná. V přítomnosti PDGF-BB bylo na spodní straně detekováno o 33,7% více buněčných jader než při negativní kontrole. Tento údaj je přitom nejvíce podstatný pro celkové vyhodnocení buněčné migrace, protože lze prokázat, že se buňka mnohem ochotněji pohybuje do místa s chemoatraktantem, a to včetně jadra.



**Obr. 32: Graf vyhodnocení počtu jader *Transwell* III**

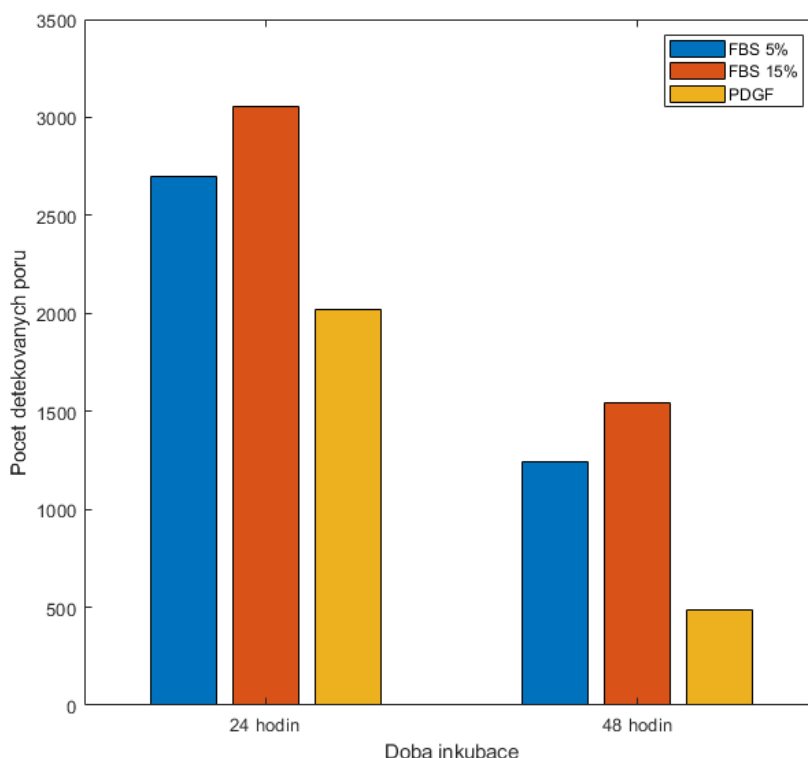
#### 8.4.5. Výsledky *Transwell* IV

Také v tomto posledním experimentu byl vyhodnocen počet detekovaných pórů, počet jader na spodní straně membrány a konfluence.

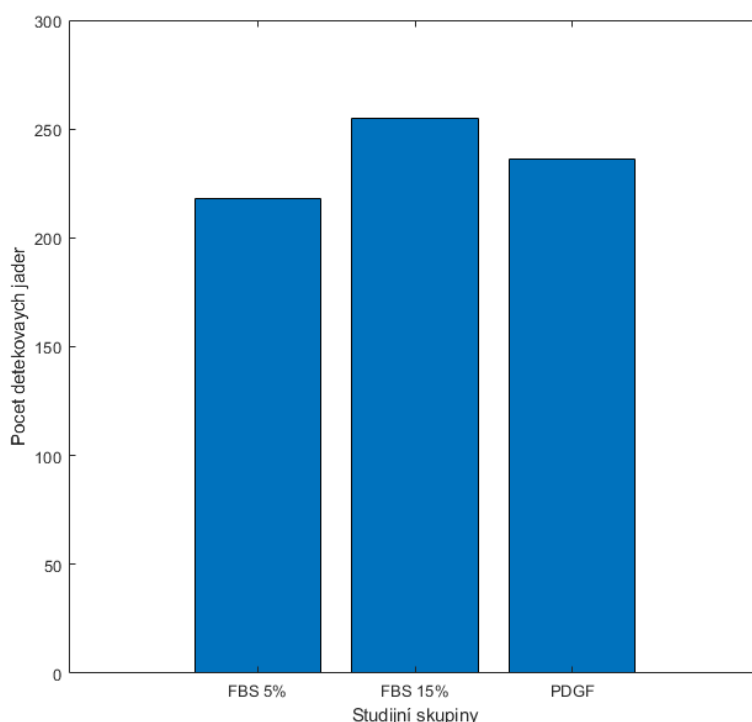
Výsledky počtu pórů v tomto případě nejsou tak pozitivní jako v předchozích experimentech. Pozitivní kontrola s FBS 15% obsahuje více detekovaných pórů než negativní kontrola s FBS 5%, PDGF-BB však nikoli. Z grafu vidíme, že po 24 i po 48 hodinách je počet pórů v případě PDGF-BB menší než v ostatních dvou případech s FBS (Obr. 33). Jedním z důvodů je menší počet buněk, tedy menší procento konfluence. Proto je také počet pórů, přes které prochází buňky, menší. Dalším důvodem může být to, že buňky s PDGF-BB již migrovaly na druhou stranu membrány. To by bylo patrné z výsledků počtu jader, které jsou popsány níže.

Co se týká vyhodnocení počtu jader v experimentu *Transwell* IV, tato hodnota je v přítomnosti PDGF-BB o téměř 7% větší než při negativní kontrole. (viz Obr. 34) Buňky tedy skutečně ochotněji migrují, pokud je zde vytvořen kladný gradient chemoatraktantu. Rozdíl však v tomto případě není tak markantní a počet detekovaných jader s PDGF nepřekročil hodnotu detekovaných jader při pozitivní kontrole. To může být dáno již zmíněnou menší kofluencí než v kontrolních vzorcích.

V tabulce konfluence vidíme, že množství buněk bylo větší v případě kontrolních experimentů než v přítomnosti chemoatraktantu (Tab. 5). Zatímco vzorky s FBS mají konfluenci po 24 hodinách kolem 24%, v přítomnosti PDGF-BB je to necelých 19%. Procento s PDGF-BB je nepatrně menší při srovnání s negativní kontrolou také po seškrábnutí svrchní strany membrány.



Obr. 33: Graf vyhodnocení počtu pórů *Transwell* IV, v levé části zobrazen výsledek po 24 hodinách, v pravé části po 48 hodinách



Obr. 34: Graf vyhodnocení počtu jader *Transwell IV*

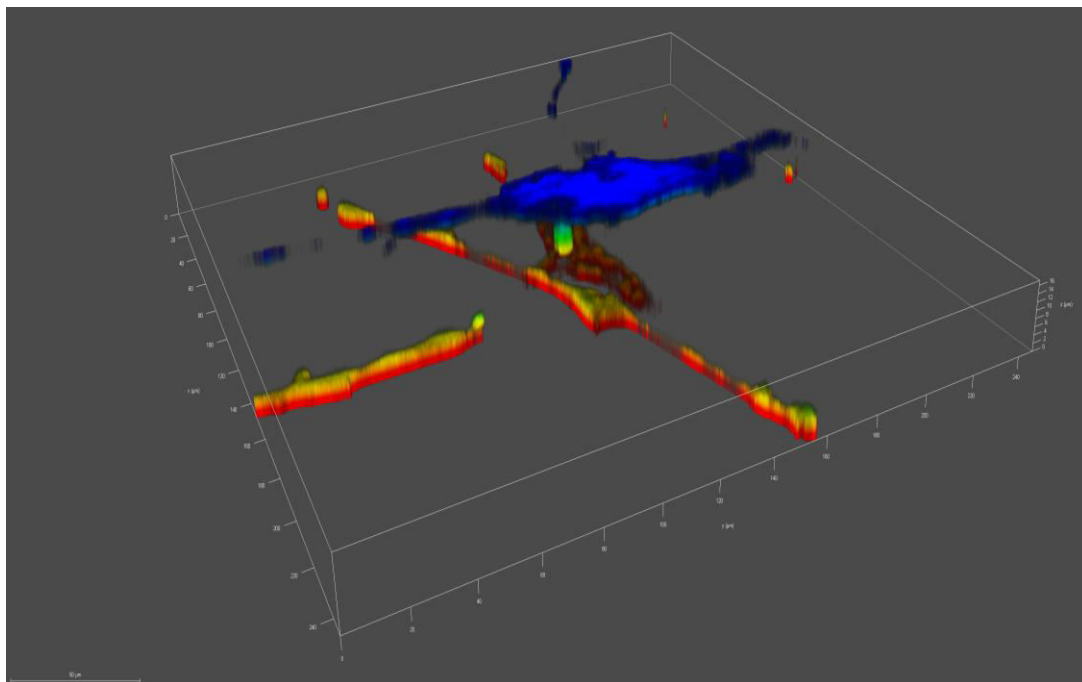
Tab. 5: Konfluence experimentu *Transwell IV* po 24, 48 hodinách a po následném odstranění vrchní strany membrány

	Konfluence po 24 hod. [%]	Konfluence po 48 hod. [%]	Konfluence po seškrábnutí [%]
FBS 5%	23,6	22,5	7,0
FBS 15%	24,0	8,1	5,4
PDGF-BB	18,9	11,2	6,2

### 8.5. Optimalizace použitých metod

Dalším způsobem vyhodnocení pohybu buňky je vytvoření 3D obrazu pomocí softwaru mikroskopu LAS X. Na obrázku níže zobrazena MSC buňka po této rekonstrukci (viz Obr. 35). Obraz je vytvořen z jednotlivých řezů Z rovin, které jsou spojeny a tak tvoří 3D obraz. Jednotlivé roviny jsou barveny tak, že vytváří určitý gradient, pomocí kterého lze rozeznat hloubku zobrazení. Vidíme tedy, že buňka se nachází jak z vrchní, tak částečně ze spodní strany membrány, přičemž je rozeznatelný také pór, přes který prochází. Nicméně toto vyhodnocení je možné provést pouze při zvětšení 63x, nikoli při zvětšení 10x, které bylo použito pro tuto práci. Pokud bychom chtěli skenovat jednotlivé roviny na zvětšení 63x, vyžadovalo by to skenování o několik hodin delší a výpočetně náročnější zpracování. Jinou možností by bylo naskenování jen několik náhodně vybraných polí, které by se následně vyhodnocovaly, ale nezískali bychom tak informaci

o celé ploše membrány. Proto tato metoda nebyla v této práci dále využita a byla ponechána jako možná optimalizace vyhodnocování již provedených metod.



**Obr. 35: 3D rekonstrukce buňky pomocí softwaru mikroskopu LAS X**

Pořízení snímků na zvětšení 63x by mohlo přinést také další výhodu. Bylo by možné lépe rozeznat obě strany membrány i bez nutnosti odstranění jejích vrchní části. Při tomto zvětšení lze totiž lépe nastavit rovinu Z a lze tedy naskenovat nejprve jednu stranu membrány, poté druhou, případně i rovinu obsahující jen póry. Jak ale již bylo zmíněno, tento proces je výpočetně náročný, a proto také nebyl pro tuto práci dále zvolen.

Další optimalizací je obarvení jader i před fixací a procentuální určení jader na spodní straně membrány. V posledních dvou experimentech bylo využito barvení DAPI, pomocí kterého byl určen počet jader na spodní straně membrány po seškrábnutí její vrchní vrstvy. Takto lze provést vyhodnocení pouze v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti chemoatraktantu a určit, o kolik se liší počet jader s PDGF-BB než v případě negativní, případně pozitivní kontroly. Pokud by jádra byla označena dříve, bylo by možné provést skenování např. po 48 hodinách již s obarvenými jádry, poté provést fixaci a seškrábnutí membrány a opět vzorek naskenovat. Získali bychom tak informaci o počtu jader před i po seškrábnutí, takže by bylo navíc možné procentuálně určit, kolik jader skrz membránu projde v rámci jednoho experimentu v závislosti na použitém chemoatraktantu.

# ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá migrací MSC na principu chemotaxe. V teoretické části se zaměřuje na problematiku kmenových buněk a jejich využití. Více pak byl kladen důraz na popis a využití mesenchymálních kmenových buněk a jejich izolaci z tukové tkáně, kostní dřeně, pupečnickové krve a rakovinné tkáně. Další kapitola byla zaměřena na princip buněčné migrace a na některé studie zabývající se různými způsoby chemotaxe *in vitro*. Mezi 2D studie patří Dunnova komůrka, *μ-Slide Chemotaxis*, Boydenova komůrka a *Transwell* migrační test, založen na principu Boydenovy komůrky. Jedna podkapitola je věnována 3D metodě studia chemotaxe v kolagenovém gelu. Vzhledem k tomu, že cílem této práce je sledování a vyhodnocení migrace MSC na základě stanoveného gradientu, je dále popsáno několik studií migrace těchto buněk, a to experimentální a klinické aplikace MSC u míšního poranění, migrace MSC na místo akutního infarktu myokardu, *Transwell* test migrace MSC z tkáně rakoviny prsu a léčba intrakraniálního aneurysmatu pomocí MV MSC. Gradient způsobující pohyb buněk je dosažen aplikací chemoatraktantu do blízkosti MSC. Proto je právě chemoatraktantům věnována samostatná kapitola, ve které byl kladen důraz na popis PDGF-BB. Právě tento růstový faktor byl použit v experimentální části této diplomové práce při studiu migrace buněk. Jedna kapitola je také věnována konfokální mikroskopii včetně popisu vzniku fluorescence při excitaci vzorku.

Experimentální část této práce probíhala v buněčné laboratoři a jejím cílem bylo praktické ověření kultivace buněčné linie MSC izolované z adipocytů. Kultivace probíhala ve 24jamkových polích, kde byla kontrolována adheze a konfluence buněk. Pro zajištění jejich vitality bylo potřeba pravidelně měnit živné medium a po určité době zajistit pokračování linie pasážováním. Při pasáži byla část buněk použita pro experiment založený na principu chemotaxe pomocí *μ-Slide Chemotaxis* a pomocí *Transwell* migračního testu. Co se týká *μ-Slide Chemotaxis*, bylo provedeno několik experimentů, nicméně očekávané výsledky nebyly získány. Kultivace MSC byla v našich laboratorních podmínkách náročná a buňky se rozmnožovaly relativně pomalu. Bylo zjištěno, že tato metoda pro studii jejich migrace není zcela vhodná. Jejich koncentrace nebyla pro experiment dostačující kvůli jejich malému počtu a vzhledem k tomu, že MSC jsou poměrně velké buňky (dosahují velikosti kolem 250  $\mu\text{m}$ ), byl problém jejich udržení v pozorovací oblasti. Buňky totiž nestihly adherovat a po přidání živného media se rozprostřely do celého prostoru, což znemožnilo sledování jejich migrace.

Vzhledem k tomu, že navržený experiment *μ-Slide Chemotaxis* byl otestován, ale výsledky nebyly získány, bylo nutné metodu optimalizovat, případně nahradit vhodnější metodou. Proto byla v další části práce zvolena metoda *Transwell* migračního testu, která je založena na principu Boydenovy komůrky. Celkem byly provedeny čtyři experimenty *Transwell*. První byl zaměřen na pozorování změny migrace MSC v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti FBS. Bylo zjištěno, že MSC migrují ochotněji skrz membránu, pokud je v kultivačním mediu FBS. Proto bylo v následujících

experimentech použito medium s 15% FBS jako pozitivní kontrola, medium s 5% FBS jako negativní kontrola a třetí vzorek byl sledován jako odpověď na přítomnost chemoatraktantu PDGF-BB. MSC byly tedy vždy nasazeny do tří jamek a následně byly skenovány pomocí konfokálního mikroskopu při zvětšení 10x po 24 hodinách, 48 hodinách a po odstranění vrchní části membrány. Ta byla odstraněna z toho důvodu, že pro správné vyhodnocení bylo potřeba znát stav membrány ze spodní strany, kde se nacházel chemoatraktant.

Zpracování výsledků probíhalo v programovacím prostředí Matlab R2020a pomocí *Image Processing Toolbox™*, který poskytuje řadu nástrojů pro zpracování a analýzu obrazů. Pro vyhodnocení byly analyzovány tři parametry, a to počet pórů v membráně, přes kterou buňky migrovaly, celková konfluence buněk a počet jader po seškrábnutí vrchní strany membrány. Tyto parametry byly zvoleny pro sledování migrace MSC a ukázalo se, že se jsou pro vyhodnocování *Transwell* experimentů výhodné. Při zpracování bylo využito zejména metody prahování, přičemž prahy byly nastaveny empiricky. Výsledky všech experimentů byly následně popsány a diskutovány. Prokázalo se, že MSC skutečně reagují na rozdílnou koncentraci chemoatraktantu a že ochotněji migrují do prostředí obsahující růstový faktor PDGF-BB. Detekce pórů je větší v případě, že ve spodní komůrce je přítomný chemoatraktant, zároveň je také detekováno více buněčných jader na spodní straně membrány. V experimentu *Transwell* III jsou výsledky pozorovatelné nejlépe. Detekovaný počet pórů je zde srovnatelný s pozitivní kontrolou, což dokazuje, že v přítomnosti PDGF-BB buňky více aktivně migrují přes membránu. S PDGF-BB je také nejvíce jader přítomno na opačné straně membrány, a to až o 33,7% více než v případě 5% FBS. Aby buňka migrovala celá včetně jádra, musí vykonat aktivní pohyb přes membránu, který se jí vyplatí pouze tehdy, pokud migruje do výhodnějšího prostředí. Na základě tohoto experimentu lze říci, že PDGF-BB toto prostředí pro MSC vytváří.

Chemotaxe se podílí na celé řadě fyziologických i patologických jevů. Navíc mesenchymální kmenové buňky v posledních letech podléhají mnoha výzkumům a s novými vědomostmi objevujeme další možnosti jejich využití. Bylo zjištěno, že působením gradientu mají tendenci migrovat určitým směrem a nahrazovat poškozenou tkáň. To využíváme při *in vitro* studiích, kde vytváříme tento gradient uměle na základě různé koncentrace chemoatraktantu. I přes počáteční neúspěch metody *μ-Slide Chemotaxis* v experimentální části této práce se podařilo pomocí *Transwell* testu dokázat závislost pohybu buněk na přítomném chemoatraktantu. Další optimalizací těchto metod bychom mohli dosáhnout výsledků, které nám přinesou nové znalosti potřebné pro další výzkum. I přes to, že manipulace s kmenovými buňkami není jednoduchou záležitostí a bude potřeba provést ještě řadu studií, přináší tato oblast příslib řešení mnoha dosud neléčitelných nebo velmi obtížně léčitelných nemocí.

# Použitá literatura

- [1] RAJA, Waseem Khan, et al. A new chemotaxis device for cell migration studies. *Integrative Biology*, 2010, 2.11-12: 696-706.
- [2] VASATURO, Angela, et al. A novel chemotaxis assay in 3-D collagen gels by time-lapse microscopy. *PloS one*, 2012, 7.12: e52251.
- [3] HOLEK, Michal. *Využití mesenchymálních kmenových buněk z tukové tkáně pro léčebné účely* [online]. Brno, 2014 [cit. 2019-11-02]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/ucs8e/Plny\\_text\\_prace.pdf](https://is.muni.cz/th/ucs8e/Plny_text_prace.pdf). Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Prof. MUDr. Jaroslav Michálek Ph.D.
- [4] *R&D Systems: Mesenchymal Stem Cells* [online]. Minneapolis, 2019 [cit. 2019-11-04]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/research-area/mesenchymal-stem-cells>
- [5] MICHALOVÁ, E., P. KOVÁŘÍKOVÁ, P. BOUCHAL a E. MICHALOVÁ. *Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk* [online]. Brno, 2014, , 6 [cit. 2019-11-17]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/395/4472.pdf>
- [6] KOVÁŘOVÁ, K. Pozorování vlivu vnějšího prostředí na živé buňky holografickým mikroskopem. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 52 s. Vedoucí Ing. Aneta Křížová.
- [7] Interleukin 8. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2019 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Interleukin\\_8](https://cs.wikipedia.org/wiki/Interleukin_8)
- [8] Claire M Wells a Anne Ridley. *Analysis of cell migration using the Dunn chemotaxis chamber and time-lapse microscopy* [online]. February 2005, 13 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/8150582\\_Analysis\\_of\\_cell\\_migration\\_using\\_the\\_Dunn\\_chemotaxis\\_chamber\\_and\\_time-lapse\\_microscopy](https://www.researchgate.net/publication/8150582_Analysis_of_cell_migration_using_the_Dunn_chemotaxis_chamber_and_time-lapse_microscopy)
- [9] Kultivace buněk in vitro [online]., 18 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: [https://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky\\_MM09.pdf](https://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf)
- [10] 2D and 3D Chemotaxis Assays Using  $\mu$ -Slide Chemotaxis: Application Note 17 [online]. 2016, , 18 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN17\\_Chemotaxis2Dand3D.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN17_Chemotaxis2Dand3D.pdf)
- [11] Co jsou kmenové buňky? THE NICHE [online]. laboratoř Knoepfler, UC Davis School of Medicine, Sacramento, California, 2019 [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: <https://ipscell.com/co-jsou-kmenove-bunky/>
- [12] What are stem cells, and what do they do? *Medical News Today* [online]. Healthline Media UK Ltd, Brighton, UK: Red Ventures Company, 2019 [cit. 2019-12-21]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/200904.php>
- [13] *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie: Experimentální a klinické aplikace mesenchymálních kmenových buněk u míšního poranění* [online]. Ústí nad Labem, 2014, (5/2014) [cit. 2019-12-23]. ISSN 1210-7859. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2014-5-2/experimentalni-a-klinicke-aplikace-mesenchymalnich-kmenovych-bunek-u-misniho-poraneni-49672>



- [14] KOLLAR, Katarina, Matthew M. COOK, Kerry ATKINSON a Gary BROOKE. Molecular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Migration to the Site of Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2009, , 9 [cit. 2019-12-23]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2009/904682/abs/>
- [15] Tomasova L, Guttenberg Z, Hoffmann B, Merkel R (2019) Advanced 2D/3D cell migration assay for faster evaluation of chemotaxis of slow-moving cells. *PLoS ONE* 14(7):e0219708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219708>
- [16] CellTracker™ Green CMFDA Dye. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Brno [cit. 2019-12-26]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C2925#/C2925>
- [17] Boyden Chamber Technique. *Merck* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2019-12-26]. Dostupné z: <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/antibodies-assays/assays-overview/cell-invasion-migration-assays/boyden-chamber-technique/I0qb.qB.KSMAAAFANtY.1ZcQ.nav>
- [18] ČMIEL, Vratislav. *Biofyzika: Studium buněčné migrace a invazivity – in vitro/vivo* In: . VUT v Brně, 2018/2019 [cit. 2019-12-26].
- [19] Mesenchymal Stem Cells from Extra-Embryonic Tissues for Tissue Engineering – Regeneration of the Peripheral Nerve. In: *IntechOpen* [online]. London, 2013 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/mesenchymal-stem-cells-from-extra-embryonic-tissues-for-tissue-engineering-regeneration-of-the-perip>
- [20] *Biochemické pojmy: Da* [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: [https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.help.htm](https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm)
- [21] KANEKO, Jiro J., John W. HARVEY a Michael BRUSS. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* [online]. Boston: Elsevier, 2008 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3. ISBN 9780123704917.
- [22] PETŘEK, Martin. Chemotaktické cytokiny (chemokiny). *LABORATORY OF IMMUNOGENOMICS AND IMMUNOPROTEOMICS* [online]. Olomouc, 2011 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <http://www.dr-petrek.eu/documents/Chemokiny.pdf>
- [23] Platelet-Derived Growth Factor-BB human. *Merck KGaA* [online]. Germany [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p3201?lang=en&ion=CZ>
- [24] PDGF-BB: Human Platelet Derived Growth Factor-BB. *Cell Applications* [online]. San Diego, 2019 [cit. 2019-12-31]. Dostupné z: <https://www.cellapplications.com/pdgm-bb-human-platelet-derived-growth-factor-bb>
- [25] PARTRIDGE, Jeff. *Migration of Human Mesenchymal Stem Cells Using Corning® FluoroBlok™ Cell Culture Inserts* [online]. Tewksbury, , 4 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-DL-CC-054%20REV1%20DL.pdf>
- [26] PARTRIDGE, Jeff a Stephen RIMSA. *New PET Membrane for Corning® FluoroBlok™ 3.0 µm and 8.0 µm Pore Size Cell Culture Inserts* [online]. Tewksbury, , 4 [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: [https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-DL-CC-042\\_REV1.pdf](https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-DL-CC-042_REV1.pdf)

- [27] Corning® FluoroBlok™ 24-Multiwell Insert Systems, PET Membrane. *CORNING* [online]. Corning, New York [cit. 2020-03-18]. Dostupné z: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Permeable-Supports/Inserts/Corning%C2%AE-FluoroBlok%E2%84%A2-24-Multiwell-Insert-Systems%2C-PET-Membrane/p/corningFluoroBlokCellCultureInsertsFor24WellPlates>
- [28] ZHANG, CHUNFU, WEI ZHAI, YAN XIE, QIAOLIN CHEN, WEI ZHU a XIAOCHUN SUN. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro. *Oncology Letters* [online]. 2013, 6(6), 1577-1582 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.3892/ol.2013.1619. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2013.1619>
- [29] What is cell migration? *MBINFO defining mechanobiology* [online]. National University of Singapore, 2018 [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://www.mechanobio.info/development/what-is-cell-migration/>
- [30] SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání. 4. české vydání*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-4271-7.
- [31] Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Asadi Rada, Assadzadeh-AghdaeiH, Sharifian A, et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bonemarrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017; 10(3):208-213.
- [32] HARSAN, Harsan, Silmi MARIYA, Andi Asadul ISLAM, Eka Julianta WAHJOEPRAMONO a Irawan YUSUF. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *The Indonesian Biomedical Journal* [online]. 2015, 7(3), 153-6 [cit. 2020-03-29]. DOI: 10.18585/inabj.v7i3.181. ISSN 2355-9179. Dostupné z: <https://inabj.org/index.php/ibj/article/view/181>
- [33] Protocol for Mesenchymal Stem Cell Isolation. *FUJIFILM Irvine Scientific* [online]. Santa Ana, CA, Wicklow, Ireland [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://www.irvinesci.com/protocol-for-mesenchymal-stem-cell-isolation>
- [34] HAAS, Petra a Rolf BORLINGHAUS. Confocal and Digital Light Sheet Imaging. *Leica Microsystems* [online]. 11. 5. 2015 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/confocal-and-digital-light-sheet-imaging/>
- [35] *Enciclopedia Britannica* [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/microscope/Confocal-microscopes>
- [36] *Konfokální mikroskop* [online]. VUT v Brně, , 5 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: [http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/konfokalni\\_mikroskopie.pdf](http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/konfokalni_mikroskopie.pdf)
- [37] FELLERS, Thomas J. a Michael W. DAVIDSON. *Introduction to Confocal Microscopy* [online]. National High Magnetic Field Laboratory, 1800 East Paul Dirac Dr., The Florida State University, Tallahassee, Florida, 32310. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>
- [38] ŠKODA, Jan. *Konfokální mikroskopie a nové trendy ve fluorescenční mikroskopii* [online]. In: . Ústav experimentální biologie PřF MU, s. 48 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8920/um/2017\\_05\\_Konfokalni\\_mikroskopie\\_a\\_nove\\_trendy.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8920/um/2017_05_Konfokalni_mikroskopie_a_nove_trendy.pdf)
- [39] COKER, Alex B. a Michael W. DAVIDSON. Education in Microscopy and Digital Imaging: Comparison Between Confocal and Widefield Microscopy. *ZEISS* [online]. [cit. 2020-04-

- 21]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/opticalsectioning/confocalwidefield/indexflash.html>
- [40] NERADIL, Jakub. *Princip fluorescence* [online]. In: . Ústav experimentální biologie PřF MU, 2015, s. 47 [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi8920/um/2016\\_01\\_TISK\\_princip\\_fluorescence.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi8920/um/2016_01_TISK_princip_fluorescence.pdf)
- [41] DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html?SID=fr-dapi-main>
- [42] *How does a confocal microscope work?* [online]. [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: <http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks//confocal/>
- [43] REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. *Encyklopedie fyziky* [online]. 2006-2020 [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/>
- [44] JOHNSON, Mary. Fetal Bovine Serum. *Materials and Methods* [online]. 2012, 2 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.13070/mm.en.2.117. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html>
- [45] YANG, Hao, Xue GOU, Yong WANG, Tarek M. FAHMY, Anskar Y.-H. LEUNG, Jian LU a Dong SUN. A Dynamic Model of Chemoattractant-Induced Cell Migration. *Biophysical Journal* [online]. 2015, 108(7), 1645-1651 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.12.060. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349515002258>
- [46] HASSAN, Ghmkin, Issam KASEM, Chadi SOUKKARIEH a Majd ALJAMALI. A Simple Method to Isolate and Expand Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells: Using Explant Method and Umbilical Cord Blood Serum. *International Journal of Stem Cells* [online]. 2017, 10(2), 184-192 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.15283/ijsc17028. ISSN 2005-5447. Dostupné z: <http://www.ijstemcell.com/journal/view.html?doi=10.15283/ijsc17028>
- [47] LIU, Jia, Atsushi KUWABARA, Yoshinobu KAMIO, Shuling HU, Jeonghyun PARK, Tomoki HASHIMOTO a Jae-Woo LEE. Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Prevent the Rupture of Intracranial Aneurysm in Part by Suppression of Mast Cell Activation via a PGE2-Dependent Mechanism. *STEM CELLS* [online]. 2016, 34(12), 2943-2955 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1002/stem.2448. ISSN 10665099. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2448>
- [48] SUN, Xiaojiao, Xu GAO, Lingyun ZHOU, Lijun SUN a Changlian LU. PDGF-BB-induced MT1-MMP expression regulates proliferation and invasion of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen via MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT signaling. *Cellular Signalling* [online]. 2013, 25(5), 1279-1287 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.01.029. ISSN 08986568. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656813000430>
- [49] *Leica microsystemes: Software platform for life science LAS X Life Science* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/>
- [50] Transwell® Permeable Supports, Polycarbonate (PC) Membrane. *Corning* [online]. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Permeable-Supports/Inserts/Transwell%C2%AE-Permeable-Supports%2C-Polycarbonate-%28PC%29-Membrane/p/TranswellPermeableSupportsPolycarbonatePCMembrane>
- [51] *Počítání buněk* [online]. Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AV ČR, , 3 [cit. 2020-05-25]. Dostupné z: [http://www.rustreg.upol.cz/\\_materials/bubcv/BUBCV4.pdf](http://www.rustreg.upol.cz/_materials/bubcv/BUBCV4.pdf)

# Seznam zkratek a veličin

MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i> , mesenchymální kmenové buňky
BM-MSC	<i>Bone marrow MSC</i> , MSC odvozené z kostní dřeně
CD105	Klastr diferenciaci 105, endoglin, transmembránový protein
CD73	Klastr diferenciaci 73, enzym ekto-5'-nukleotidáza
CD90	Klastr diferenciaci 90, glykoprotein
CD45	Klastr diferenciaci 45, protein tyrosin fosfatáza
CD34	Klastr diferenciaci 34, transmembránový fosfoglykoprotein
CD14	Klastr diferenciaci 14, antigenní protein
CD11b	Klastr diferenciaci 11, protein
CD79 alfa	Klastr diferenciaci 79, transmembránový protein
CD19	Klastr diferenciaci 19, antigen B-lymfocytů
TGF alfa/beta	Cytosin regulující imunitní funkce a proliferaci
EGF	Rekombinantní epidermální růstový faktor
BMP-3	Kostní morfogenetický protein 3
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> , Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii
PBS	Fosfátový pufr
ml, µl	Mililitr, mikrolitr
nm, µm, mm, cm	Nanometr, mikrolitr, mililitr, centimetr
µm <sup>2</sup>	Mikrometr čtverečný
mm <sup>3</sup>	Milimetr čtverečný
°C	Stupně Celsia
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
FBS	<i>Fatal bovine serum</i> , Fetální bovinní sérum
NH <sub>4</sub> Cl	Chlorid amonný
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ATP	Adenosintrifosfát
IL-8	Interleukin-8
mg/ml	Miligram na mililitr
ng/ml	Nanogram na mililitr
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
HT-1080	Buňky fibrosarkomu
PET	Polyetylen-tereftalátu
PDGF	Růstový faktor odvozený z krevních destiček
SDF-Lb	Rekombinantní faktor odvozený ze stromu
IGF-1	Lidský rekombinantní růstový faktor
3T3	Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů
DAPI	Modré fluorescenční barvivo pro obarvení jader
BC-MSC-CM	Kmenové buňky odvozené z kostní dřeně

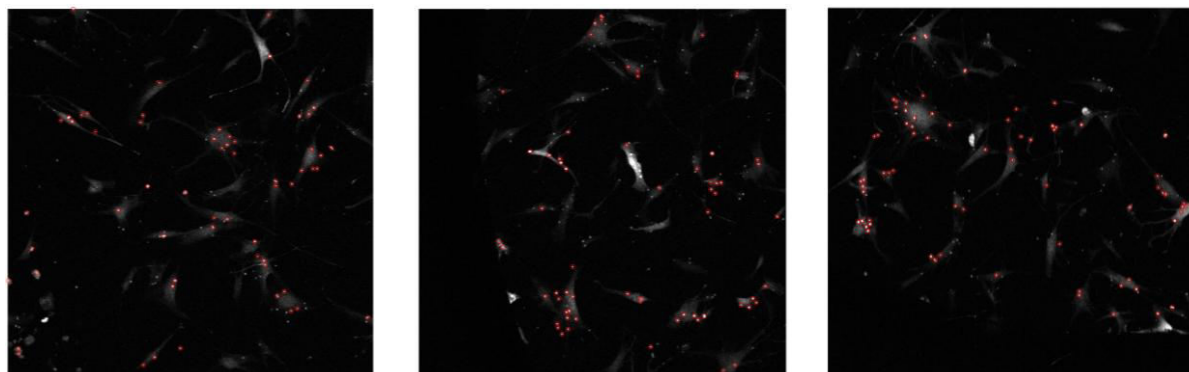
CNS	Centrální nervová soustava
kDa	1 Da = jedna dvanáctina atomové hmotnosti uhlíku, která odpovídá 1,66·10 <sup>-27</sup> kg
C	Lymfotaktin
CC	Chemokin RANTES
CXC	Interleukin-8
CX3C	Chemokin
IL-6	Interleukin-6
E. coli	Escherichia coli
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
CMFDA	Barvivo 5-chlormethylfluorescein diacetát
dH <sub>2</sub> O	Demineralizovaná voda
UV	Ultrafialové záření
RTG	Rentgenové záření
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> , Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce
MV MSC	mikrovezikuly odvozené z MSC

# Seznam příloh

Příloha A.....	67
Příloha B.....	69

# Příloha A

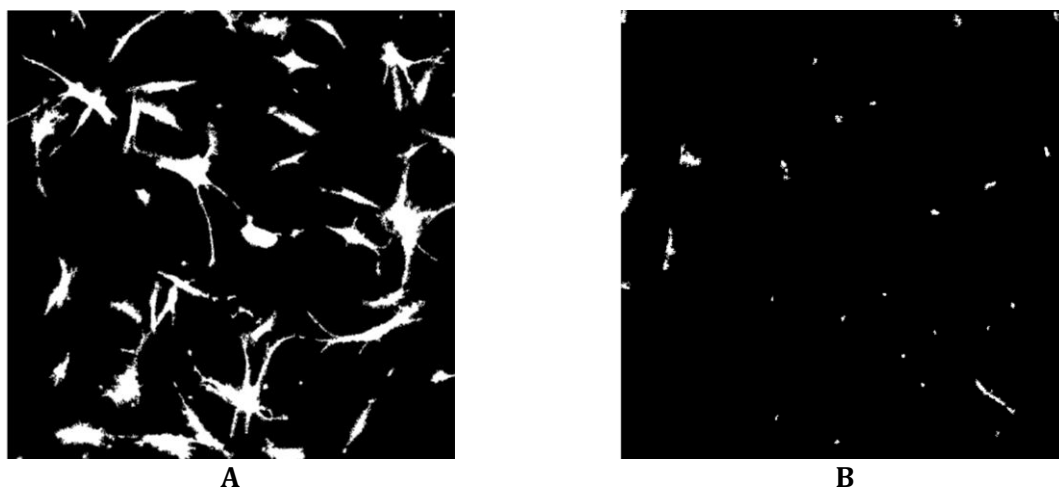
## Obrazy z experimentu *Transwell* III



A B C  
Obr. 1: Detekované póry po 48 hodinách; A – negativní kontrola, B – pozitivní kontrola, C – chemoatraktant PDGF-BB



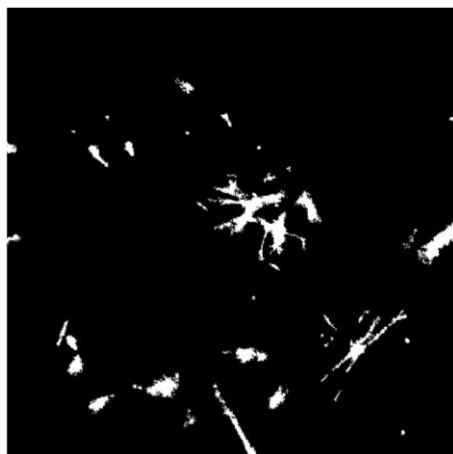
A B C  
Obr. 2: Detekovaná buněčná jádra; A – negativní kontrola; B – pozitivní kontrola; C – chemoatraktant PDGF-BB



A B  
Obr. 3: Konfluence buněk negativní kontroly; A – po 48 hodinách inkubace, B – po seškrábnutí membrány



A

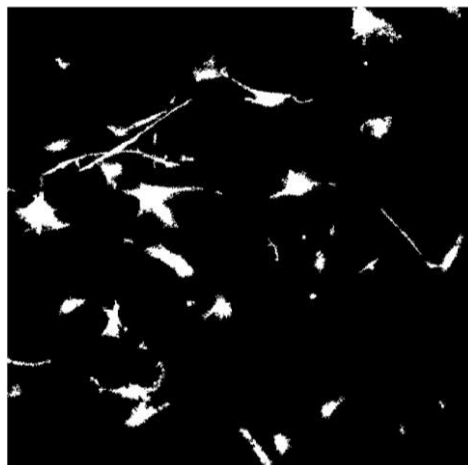


B

Obr. 4: Konfluence buněk pozitivní kontroly; A – po 48 hodinách inkubace, B – po seškrábnutí membrány



A



B

Obr. 5: Konfluence buněk s chemoatraktantem PDGF-BB; A – po 48 hodinách inkubace, B – po seškrábnutí membrány



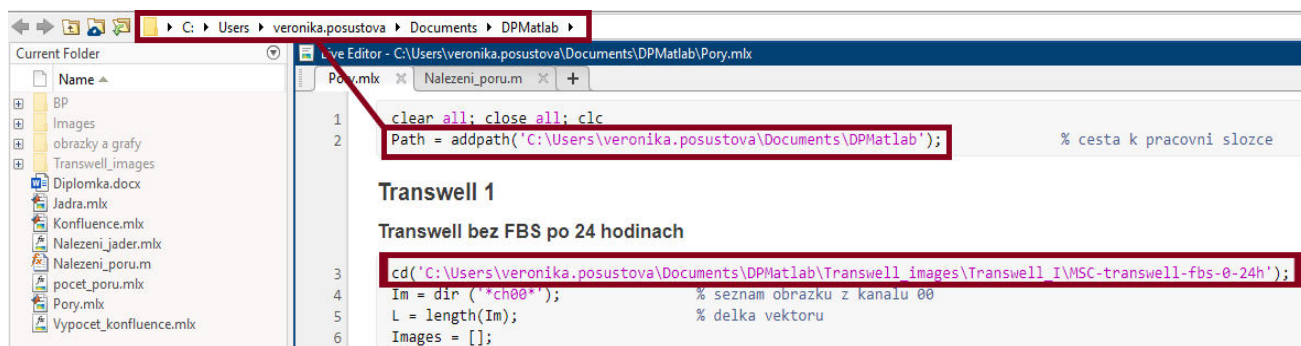
# Příloha B

## Manuál k ovládání algoritmů

- Nalezení pórů v membráně
- Konfluence buněk
- Detekce buněčných jader

### 1. Nastavení cesty k souborům

Pro každý algoritmus je nejprve nutné nastavit cestu k souborům pomocí příkazu *addpath*, odkud jsou funkce volány. Poté se přepíná do složky k obrazům pomocí *cd*. Obrazy jsou uloženy pro každý experiment zvlášť, takže před každým voláním funkce je nejdříve nastavena cesta k datům.



Obr. 1: Nastavení cesty k souborům

### 2. Algoritmus pro detekci pórů v membráně

#### 2.1. Manuál k ovládání live skriptu *Pory.mxl* a funkce *Nalezeni\_poru.m*

Funkce *Nalezeni\_poru.m* slouží k detekci pórů v membráně, kterými prošly buňky. Je volána v live skriptu *Pory.mxl*. Dále je nastaven práh pro vytvoření masky, která obsahuje jen pixely, které jsou v obraze větší než daný práh. Protože se obrazy jednotlivých experimentů v některých případech liší, je nastavován pro každý experiment zvlášť. Práhy byly nastaveny empiricky a lze je uživatelem měnit.

```
% funkce na nalezeni poru
prah = 143; % prah pro prahovani obrazu
[Pory_fbs0_24h, centroid_fbs0_24h] = Nalezeni_poru(Images,L,prah) % volani funkce
```

Obr. 2: Nastavení prahu

Vstupem funkce jsou obrazy z jednoho experimentu, jejich počet a práh. Výstupem jsou pozice pórů, jejich centroidy a jednotlivé obrazy s vyznačenými póry. Vykreslení obrazů je však zakomentované kvůli snížení náročnosti výpočtu a času. Pro vykreslení obrazů je nutné znak % odstranit a zároveň zakomentovat pomocnou masku, která obraz zmenší o 10%. Pro vykreslení je však potřebná původní velikost obrazu.

```

for i = 1:L
    BW{i} = Images{i} > prah;           % prah pro masku urceny experimentalne
    Maska{i} = Images{i};
    Maska{i}(~BW{i}) = 0;               % vytvoreni masky: pozice, které mají menší hodnotu než prah, jsou nastaveny na 0

    [S1,S2] = size(Maska{i});           % rozmery masky
    S1_1 = round(0.05*S1);              % 5% rozměru S1 (zaokrouhleno)
    S1_2 = round(0.95*S1);              % 95% rozměru masky S1 (zaokrouhleno)
    S2_1 = round(0.05*S2);              % 5% rozměru masky S2 (zaokrouhleno)
    S2_2 = round(0.95*S2);              % 95% rozměru masky S2 (zaokrouhleno)
    Maska{i} = Maska{i}(S1_1:S1_2,S2_1:S2_2); % omezení rozměru masky o 5% z každé strany, kvůli překryvu obrázku
end

```

Obr. 3: Zakomentování řádku

### 3. Algoritmus pro detekci buněčných jader

#### 3.1. Manuál k ovládání live skriptu *Jadra.mxl* a live funkce *Nalezeni\_jader.mxl*

Funkce *Nalezeni\_jader.mxl* je volána pro každý experiment ve skriptu *Jadra.mxl*. Ve funkci jsou nastaveny prahy pro odstranění malých objektů. Jsou nastaveny empiricky a lze je uživatelem měnit. Pro vykreslení detekovaných jader je nutné odstranit znak % před příkazem *figure* a *imshow*.

```

BW = [];
BW1 = [];
BW2 = [];
jadra = [];
P1 = 70;           % prah pro odstranění menších objektů než P1
P2 = 450;          % prah pro odstranění větších objektů než P2
S = [];

for i = 1:L
    BW1{i} = imbinarize(Images{i}); % převod obrázku do cb
    BW1{i} = bwareaopen(BW1{i},P1); % odstranění objektů menších než nastavený prah P1
    BW2{i} = bwareaopen(BW1{i},P2); % odstranění menších objektů z obrázku než prah P2
    BW{i} = BW1{i} - BW2{i};         % vytvoření obrázku, který neobsahuje objekty větší, než P2
    BW{i} = imbinarize(BW{i});

```

Obr. 4: Nastavení prahů

### 4. Algoritmus pro výpočet konfluencí buněk

#### 4.1. Manuál k ovládání live skriptu *Konfluence.mxl* a live funkce *Vypocet\_konfluence.mxl*

Funkce *Vypocet\_konfluence.mxl* je volána pro každý experiment ve skriptu *Konfluence.mxl*. Před tím jsou nastaveny prahy pro převod obrázku do binárního a pro odstranění malých objektů. Prahý jsou empiricky upraveny v závislosti na vlastnostech obrázků z jednotlivých experimentů a lze je uživatelem ve skriptu měnit. Pro vykreslení obrázků je opět nutné odstranit znak % před příkazy *figure* a *imshow*.

```

T = 0.05;          % prah převodu do binárního obrázku
P = 45;             % prah pro odstranění malých objektů v obraze, určený experimentálně
Konfluence_Tb50_24h_Tiles = Vypocet_konfluence(Im, L, T, P) % volání funkce pro výpočet konfluencí

```

Obr. 5: Prahý pro funkci *Vypocet\_konfluence*